Série A, N° 3826
N° d'ordre :
4677

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

Le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

Pierre De GASQUET

1ère THESE. - "Etude de la régulation de l'inversion des D aminoacides chez le Rat. Aspect nutritionnel et mécanismes biochimiques."

2ème THESE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 31 JAN. 1962 devant la Commission d'examen

Melle. LE BRETON, Président

MM. ARCHER, STOLKOWSKY } Examinateurs.

Série A, N° 3826
N° d'ordre :
4677

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

Le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

Pierre De GASQUET

BIBLIOTHEQUE

1ère THESE. - "Etude de la régulation de l'inversion des D aminoacides chez le Rat. Aspect nutritionnel et mécanismes biochimiques."

2ème THESE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le devant la Commission d'examen

Melle. LE BRETON, Président

MM. ARCHER, STOLKOWSKY } Examinateurs.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

(Janvier 1961)

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

-- P R O F E S S E U R S -

Doyen ..... ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
PERES	T	Mécanique des fluides et applications
BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique
PLANTEFOL	T	Botanique
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
BOULIGAND	T	Analyse appliquée à la Géométrie
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristallogr.
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie Vég. (ORSAY)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie des Fonctions
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie Générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN	T	Biologie
CHRETIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie (ORSAY)
GAUTHERET	T	Biologie (P.C.B.)
LUCAS R.	T	Recherches Physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécan. expérimentale des Fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Biologie Végétale (P.C.B.)
DE CUGNAC	T	Biologie Végétale (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie Physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HERITIER	T	Biologie Générale (ORSAY)
GRIVET	T	Radioélectricité (ORSAY)
PONCIN	T	Mécanique Générale
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des Nombres
QUELET	T	Chimie Organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie Macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et struct.
JACQUINOT	T	Spectroscopie (ORSAY)
VASSY	T	Physique de l'Atmosphère
DESTOUCHES	T	Théories Physiques
PRUVOST	T	Géologie
AMIEL	T	Chimie des Solides
HOCART	T	Minéralogie et Cristallogr.
J.P. MATHIEU	T	Recherches Physiques
COUTEAUX	T	Biol. Animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (ORSAY)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie Végétale (P.C.B.)
GUINIER	T	Physique des Solides (ORSAY)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et Intégral
CHOUARD	T	Physiologie Végétale
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.)
BRELOT	T	Calcul différentiel
NORMANT	T	Synthèse organique générale
BENARD	T	Chimie (E.N.S.C.P.)
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T	Statistiques Mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie Végétale (E.N.S.)
MARECHAL	T	Optique théorique et Appl.
KIRRMANN	T	Théories Chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie

SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Mathématiques générales
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie Algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Calcul des Probabilités
ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique (P.C.B.)
RIZET	T	Génétique (ORSAY)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Relativité
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie (P.C.B.)
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie minérale
M. LEVY	T	Physique théorique des Hautes Energies (ORSAY)
Mme CHAIX	T	Chimie biologique
Mme HUREL-PY	T	Biologie Végétale (PCB)
PIAUX	T	Chimie (S.P.C.N.)
BRUN	T	Mécan. expérimentale des fluides
MEDERER	T	Chimie biologique
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agreg.)
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.)
MELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T	Physique (M.P.C.)
DUBOIS J.E.	T	Chimie (M.P.C.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL André	T	Chimie Minérale (ORSAY)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Physique
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie Physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER		Biologie animale (P.C.B.)
CAMUS		Biologie végétale (P.C.B.)
CASTAING	T	Physique (ORSAY)
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallogr.
MOYSE	T	Physiologie végét. (ORSAY)
PANNETIER	T	Chimie (ORSAY)
POSSOMPES	T	Biologie Animale (P.C.B.)
PULLMANN		Chimie théorique
TEILLAC	T	Physique Nucléaire et Radioactivité
TONNELAT		Biologie physico-chim.
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART		Chimie (P.C.B.)
DODE	T	Chimie (ORSAY)
FREYMANN	T	Physique (S.P.C.N.)
GUINOCHET	T	Biologie Vég. (ORSAY)
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)
Mlle JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.)
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (ORSAY)
CHAPELLE	T	Physique (ORSAY)
DELANGE	T	Mathématiques (ORSAY)
DENY	T	Mathématiques Générales (ORSAY)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie Physique
BERTHELOT	T	Physique Fondamentale des Hautes Energies (ORSAY)
BRICARD	T	Météorologie
Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie
FRIEDEL		Physique des Solides (ORSAY)
M. JULIA		Chimie Organ.Structurale
LENDER		Biologie Animale (SPCN) ORSAY
MAGAT		Physico-chimie des rayonnements
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Biochimie Cellulaire
BENOIT	T	Physiol. Anim. (ORSAY)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiol. B.M.P.V. (ORSAY)
GUERIN	T	Chimie (ORSAY)
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.)
JEAN		Physique (ORSAY)
MATTLER	T	Physique (ORSAY)
MICHEL Louis		Physique théor. (ORSAY)
RUMPF		Chimie (P.C.B.)
BERGERARD		Biol. Anim. (SPCN) (ORSAY)
BERTEIN		Electronique (ORSAY)
BOUISSIERES		Chimie des Radioéléments (ORSAY)
Mme COUTURE		Thermodynamique et Mécanique Physique
ELLENBERGER		Géologie appliquée
FRANC		Biol. Animale (P.C.B.)
SCHNELL		Botanique tropicale (ORSAY)
STOLKOWSKY		Biol. Animale (P.C.B.)
ACHER		Chimie Biol. (ORSAY)

BAUDOIN		Biologie
BEAUMONT		Biologie animale
BLAMONT		Géophysique Ionosphère
BOURREAU		Biologie Végétale (S.P.C.N.) (ORSAY)
CURIE D.		Physique (M.G.P.
DURAND-DELGA		Géologie
FREON		Chimie Organique (ORSAY)
HELLER		Physiologie végétale
TORTRAT		Calcul des Probabilités
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)
MAGNAN	T	Physique (P.C.B.)
DAUDEL		Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la Physique nucléaire
Mlle FOURCROY		Biologie Végétale (S.P.C.N.)
BARRAUD		Physiologie Cellulaire
NOIROT		Evolution des êtres organisés
Mme FOURES-BRUAT	T	Mécan. Analytique et Mécanique céleste
Mlle VEIL		Physiologie Générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale
LACOMBE	T	Métallurgie (ORSAY)
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (ORSAY)
CABANNES	T	Mécanique Générale
LESIEUR	T	Mathématiques M.P.C. (ORSAY)
MAZET	T	Mécanique générale (ORSAY)

SECRETAIRE GENERAL ..... R. POULLAIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538119_0025

A Mademoiselle E. LE BRETON, Professeur à la Sorbonne, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider et de rapporter cette thèse. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma très profonde et très respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur ACHER dont les remarques et les conseils bienveillants m'ont été une aide particulièrement précieuse pour la construction et la rédaction de ce travail.

A Monsieur le Professeur STOLKOWSKY qui a bien voulu accepter de faire partie du jury de ma Thèse et auprès de qui j'ai trouvé le meilleur accueil.

A Monsieur le Docteur J. TREMOLIERES, qui a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire et à qui je suis heureux de dire mon affectueuse gratitude pour les encouragements qu'il m'a constamment prodigués.

A Monsieur M. VIGNERON, de l'Académie de Pharmacie, et à Monsieur P. DUMAS, qui m'ont permis de réaliser ce travail et à qui j'exprime ma très respectueuse reconnaissance pour la confiance sans défaillance qu'ils ont bien voulu me témoigner.

A R. LOWY, et à tous mes amis du Laboratoire, en souvenir des bons et des mauvais jours.

ETUDE de la REGULATION de L'INVERSION DES D-AMINOACIDES CHEZ LE RAT

ASPECT NUTRITIONNEL ET MECANISMES BIOCHIMIQUES

S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE - HISTORIQUE et TECHNIQUES.	
Chapitre I - Historique	5
Chapitre II - Techniques et Méthodes expérimentales	12
DEUXIEME PARTIE - REGULATION de l'INVERSION des D AMINOACIDES.	
Chapitre I - Observations sur l'utilisation in vivo des D aminoacides. Influence de l'état nutritionnel	27
Chapitre II - Conditions de l'inversion des D aminoacides	36
Chapitre III - Régulation de l'oxydation des D aminoacides par les nucléotides adényliques	47
Chapitre IV - Régulation de la transréamination des acides cétoniques par les nucléotides adényliques	58
RESUME et CONCLUSIONS GENERALES	78
BIBLIOGRAPHIE	85

I N T R O D U C T I O N

*
* *

Les acides α-aminés que l'on rencontre dans la nature appartiennent, en général, à la série L. Des aminoacides de la série D ont cependant été isolés de quelques matériels biologiques et semblent présents de manière constante et systématique (119, 105) surtout chez certains microorganismes. Ces exceptions sont relativement rares et les aminoacides constitutifs des protéines élaborées par les animaux supérieurs et les Mammifères, en particulier, sont, à des traces près, uniquement des L aminoacides.

D'autre part, certains aminoacides ne peuvent être synthétisés par les Mammifères. Ils sont, pour cette raison, appelés indispensables, et doivent être apportés par la ration alimentaire. Or, plusieurs de ces aminoacides indispensables peuvent être remplacés dans le régime par les dérivés D correspondants qui se trouvent parfois aussi efficaces pour concourir à la synthèse des protéines. Il est donc nécessaire, pour que le chaînon carboné du D aminoacide participe à la synthèse protéique, qu'une inversion préalable ait lieu. Chez les Mammifères, qui ne possèdent pas de racémases, cette inversion doit être rendue possible par l'action successive de la D aminoacide oxydase, qui transforme un D aminoacide en acide cétonique, et des transaminases, qui assurent la réamination de l'acide cétonique en L. aminoacide. Ce mécanisme qui semble évident n'a pourtant jamais reçu de confirmation expérimentale directe.

D'ailleurs, ce serait simplifier outre mesure que de réduire la destinée des D aminoacides dans l'organisme aux seules réactions évoquées ci-dessus, ou même à la seule désamination oxydative. En effet, l'éventuelle action de la microflore intestinale sur les dérivés D, le passage de ceux-ci à travers la paroi intestinale et leur transport dans les tissus, ainsi que la possibilité d'excrétion

.../

urinaire de ces aminoacides ou des acides cétoniques sont autant de facteurs ou d'étapes qui se superposent à l'inversion proprement dite et dont la somme est exprimée par ce que l'on appelle "utilisation des D aminoacides", c'est-à-dire l'efficacité avec laquelle ils remplacent l'isomère L.

L'étude des D aminoacides, malgré leur rareté dans une alimentation ordinaire, présente un intérêt pratique non négligeable : des aminoacides racémiques sont de plus en plus employés en nutrition animale et en diététique thérapeutique. En particulier, le problème clinique soulevé par certains opérés gravement dénutris, dont la réalimentation n'est possible que par des perfusions d'aminoacides racémiques, offre un intérêt physiologique tout spécial.

En effet, la valeur biologique d'un mélange de L aminoacides n'est pas une constante, mais paraît dépendre, dans une large mesure, du niveau de l'équilibre azoté du sujet qui le reçoit, ou, en d'autres termes, de son état nutritionnel ou hormonal. Cette variation apparente des besoins en aminoacides indispensables à l'organisme correspond à une modification du catabolisme azoté, c'est-à-dire, selon toute vraisemblance, à une régulation des transaminations soit dans le sens des désaminations, soit dans celui des réaminations.

Ainsi, une double question peut se poser :

- l'utilisation des D aminoacides est-elle, comme celle des L aminoacides, susceptible de varier avec l'état nutritionnel ?

- une régulation de l'inversion des D aminoacides, transformation à laquelle contribuent les réactions de transamination, est-elle possible ?

C'est à cette double question d'ordre nutritionnel et biochimique que nous avons tenté d'apporter une réponse :

1) Nous avons d'abord comparé, sur des rats dans des états nutritionnels différents, l'effet d'un régime comportant ou non un D aminoacide.

.../

2) Ensuite, nous avons cherché à mettre en évidence une régulation des réactions de désamination oxydative et de transamination menant à l'inversion des D aminoacides, sous l'influence des nucléotides adényliques, dans des homogénats de tissus.

Les raisons du choix des nucléotides adényliques et des homogénats de tissus sont analogues et découlent des considérations suivantes :

On sait que certaines hormones ou certains états nutritionnels déterminent des modifications d'activité de nombre d'enzymes, et en particulier de la D aminoacide oxydase et des transaminases. D'autre part, il apparaît très probable que l'action des hormones sur le métabolisme entraîne un changement du rapport d'équilibre de quelques cofacteurs tels que DPN/DPNH, ou ATP/AMP, rapports qui contrôlent à leur tour une série de réactions, faisant jouer par là, à ces cofacteurs, le rôle de véritables aiguilleurs métaboliques (86, 49). De même, lors d'une agression ou de la phase de réparation qui la suit, les premières modifications tissulaires touchent précisément les concentrations relatives de ces cofacteurs (82, 118, 91, 130), avant que les phénomènes de catabolisme ou d'anabolisme azoté ne se manifestent.

C'est dans cette perspective que nous avons recherché une action possible de l'ATP et de l'AMP sur l'inversion des D aminoacides. L'intervention des nucléotides adényliques semblant s'effectuer de proche en proche par l'intermédiaire de nombreuses réactions, nous avons délibérément écarté une étude de la régulation de l'inversion au moyen d'enzymes isolés. De toute manière, une telle étude ne saurait être entreprise sans avoir été précédée d'une série d'observations au niveau de l'homogénat de tissu. L'homogénat, malgré ses servitudes, nous a paru, en effet, parfaitement adéquat au type d'approche physiologique envisagée puisque les interactions des différents multisystèmes enzymatiques cellulaires peuvent alors se manifester.

.../

En fait, nous verrons que l'importance de la régulation de l'inversion des D aminoacides que nous avons mise en évidence, dépend étroitement du fonctionnement du contexte cellulaire, et que la réaction de désamination oxydative comme les transaminations, sont soumises à l'activité générale de la cellule.

*

* *

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE et TECHNIQUES

CHAPITRE I

H I S T O R I Q U E

Un très grand nombre de travaux a été entrepris depuis une trentaine d'années concernant l'utilisation des D aminoacides. Il est ainsi possible de connaître, pour diverses espèces et pour diverses conditions, les aminoacides indispensables qui peuvent être remplacés dans le régime par l'homologue de la série D. Pour la croissance du Rat, par exemple, la D méthionine (70, 144), le D tryptophane (17, 21, 135), la D histidine (46) et la D phénylalanine (7, 113, 115, 142, 145) sont à peu près équivalents à leur isomère L ; par contre, la D lysine (18, 58), la D thréonine (139) et la D isoleucine (3,60) ont une efficacité pratiquement nulle. D'autres D aminoacides comme la D valine (142, 146) ou la D leucine (109) occupent une position intermédiaire, capables qu'ils sont de remplacer une partie seulement du L indispensable correspondant.

L'utilisation par l'organisme, à des fins de synthèse protéique, des chaînons carbonés apportés par les D aminoacides, implique une inversion de ces aminoacides en isomères L.

En effet, si l'incorporation des D aminoacides dans une chaîne peptidique est chose théoriquement de la plus grande facilité au plan de la chimie des peptides (31, 32), il ne semble pas qu'elle ait encore été observée dans des expériences biologiques.

D'après les résultats publiés par MITOMA et coll. (96), en effet, la D hydroxyproline n'est pas incorporée dans les protéines de l'embryon de poulet. De même, les D aminoacides ne subissent pas de transpeptidation sous l'influence de l'α-glutamyl transpeptidase (110).

.../

De plus, si l'activation par l'ATP des aminoacides constitue bien la première étape de la synthèse protéique (39, 123), il paraît difficile actuellement d'expliquer, par cette voie, la présence de quelques restes de D aminoacides trouvés dans les protéines des animaux supérieurs, puisque ceux-là semblent échapper à cette activation. Chez certaines Bactéries, cependant, il n'en serait pas de même (10, 11).

Ainsi, chez les animaux supérieurs, une inversion préalable des formes D semble donc nécessaire avant toute utilisation à des fins de synthèse.

D'ailleurs, cette inversion a été mise en évidence à plusieurs reprises et par différentes méthodes.

La première démonstration de l'inversion des D aminoacides, transformation appelée parfois "stéréonaturalisation", a été faite par Du VIGNEAUD et IRISH (134) avec un aminoacide non physiologique : l'acide phénylaminobutyrique ; après ingestion de l'isomère D, on peut receuillir dans l'urine l'acide N-acétyl - L phénylaminobutyrique.

D'autre part, CONRAD et BERG (45), en donnant à des rats de l'histidine uniquement sous la forme D, ont pu montrer que les protéines fabriquées par les animaux contiennent effectivement de l'histidine mais de la forme L. La D histidine ingérée a donc subi une inversion avant d'être incorporée dans les protéines.

KOTAKE et GOTO (81) ont mis en évidence une inversion du D tryptophane dans des broyats et des coupes de foie et de rein de Rat et de Souris. Après incubation du dérivé D, une formation de L tryptophane a pu être caractérisée par une méthode microbiologique.

Mais la plus élégante preuve de l'inversion a été apportée par RATNER, SCHOENHEIMER et RITTENBERG (108). On fait ingérer à un rat de la D leucine doublement marquée avec 15N et du deutérium sur le chaînon carboné. Des protéines du rat, on peut alors isoler de la leucine, marquée au deutérium, qui est de la L leucine. Mais l'azote lourd a été perdu, ce qui suppose qu'une désamination et une réamination ont eu lieu.

.../

C'est là, en effet, le schéma classique de l'inversion que BERG et coll. (21, 28, 19) ont proposé dès 1930 et précisé par la suite : une désamination du D aminoacide menant à la formation de l'acide cétonique qu'une réamination ultérieure transforme en L aminoacide.

- Les réactions de désamination des aminoacides sont connues depuis longtemps (100, 77). Les travaux de KREBS, en 1933 et 1935 (83, 84), établissent l'existence de deux activités enzymatiques distinctes, présentes à la fois dans le foie et surtout dans le rein de la plupart des vertébrés et correspondant à ce que l'on appelle actuellement la D et la L aminoacide oxydase.

La première étape de l'inversion des D aminoacides trouve ainsi un fondement enzymologique et la réaction de désamination oxydative, qui peut être réversible (106), s'écrit globalement :

(1) D aminoacide + $\frac{1}{2}\ O_2$ ⇌ acide α-cétonique + NH_3

- La réamination des acides cétoniques en dérivés L a été observée il y a une cinquantaine d'années (51, 78, 80). Les enzymes responsables de ces réaminations, les transaminases, découvertes par BRAUNSTEIN et KRITZMAN (30) catalysent le transfert des groupes NH_2 d'un L aminoacide à l'autre, suivant la réaction :

(2) L aminoacide (a) + acide cétonique (b) ⇌
acide cétonique (a) + L aminoacide (b)

En fait, on a trouvé dans les tissus des Mammifères un très grand nombre de transaminases (44, 27, 93) et ce nombre augmente constamment, si bien que, théoriquement, le donneur de groupe NH_2 peut être quelconque, comme l'ont montré les célèbres expériences de SCHOENHEIMER (120). Mais, pratiquement, on peut penser que l'acide glutamique (28, 117) ou la glutamine (92, 94) sont des donneurs de groupe NH_2 particulièrement efficaces chez les animaux supérieurs. Enfin, il faut noter que la D aminoacide oxydase est le seul enzyme connu qui s'attaque aux D aminoacides en tant que tels (on ne

.../

connaît pas de racémases chez les Mammifères), et aucun acide α-cétonique, l'α-cétoglutarate (52, 53, 1) et le pyruvate (16) mis à part, ne semble susceptible d'être aminé en L aminoacide par une voie différente de celle des transaminases.

D'autre part, de nombreuses observations in vivo (22, 33, 35, 62, 68, 112, 114, 143), montrant que, dans bien des cas, l'acide cétonique équivaut pour la croissance au L aminoacide indispensable correspondant, confirment la possibilité pour l'inversion de s'effectuer par l'intermédiaire de l'acide cétonique.

Ainsi, pour autant qu'un D aminoacide est rapidement désaminé, l'équivalence des isomères D et L serait complète puisque les acides cétoniques sont équivalents aux L aminoacides. Cela reviendrait à attribuer à la désamination oxydative un rôle primordial pour l'inversion des D aminoacides et leur utilisation par l'organisme entier. En effet, les D aminoacides qui ne sont pas désaminés, comme la D lysine ou la D thréonine (73, 101), sont effectivement inutilisés par l'organisme. Mais la D valine et la D leucine qui sont fort bien oxydées par la D aminoacide oxydase du rein de Rat (73), sont mal utilisées par le Rat entier, alors que la D histidine, qui est pratiquement aussi bien utilisée que la L histidine, n'est oxydée que très lentement par cet enzyme. On ne peut donc conclure à un simple parallélisme entre désamination oxydative et utilisation par l'organisme entier. Les transaminations jouent probablement un rôle important en contrôlant la concentration des acides cétoniques, et permettant par là une sorte de "récupération" des chaînons cétoniques pour la synthèse des L aminoacides.

Donc, l'inversion des D aminoacides, selon le schéma de BERG, semble bien être le résultat d'une désamination oxydative et d'une transamination, ces deux réactions ayant leur importance propre. De plus, ce mécanisme constitue probablement le seul moyen d'inversion des D aminoacides chez les Mammifères, ce qui est généralement admis (20, 30, 101, 108), quoique, en fait, il n'ait jamais été directement mis en évidence.

.../

Après avoir rappelé ces notions générales sur l'utilisation des D aminoacides, et en particulier sur leur inversion, il nous faut dire quelques mots de la manière dont on peut envisager une variabilité de l'utilisation des D aminoacides et une régulation de leur inversion.

On sait que l'utilisation des L aminoacides dépend de l'état nutritionnel et hormonal du sujet et que, suivant les cas, celui-ci est dit en "état d'anabolisme" ou de "catabolisme" azoté. Les "états anaboliques" qui suivent une dénutrition sont caractérisés par un catabolisme azoté très réduit (4, 66, 89, 126, 127, 136). Or, la catabolisme azoté qui aboutit à la synthèse de l'urée, est le résultat de l'équilibre entre transaminations et désaminations. Les transaminations étant une étape de la destinée des D aminoacides dans l'organisme, on peut se demander si l'utilisation de ces isomères D varie, comme celle des L aminoacides, avec l'état de nutrition. C'est à cette question que nous tenterons de répondre au début de notre travail (2éme partie, chapitre I).

De même, si la synthèse d'urée peut dépendre de l'état nutritionnel, il doit être possible de mettre en évidence au niveau de la biochimie cellulaire une régulation des transaminations et partant de l'inversion des D aminoacides.

Or, divers facteurs nutritionnels ou hormonaux sont capables de modifier dans les tissus l'activité des transaminases et aussi de la D aminoacide oxydase.

- LARDY et FELDOTT (87) rapportent que l'activité de la L aminoacide oxydase du foie varie avec le taux de protéine ingérée.

Lors d'une carence en riboflavine (34, 116, 129, 9, 102), l'activité de cet enzyme diminue fortement dans le foie et dans le rein. Elle est restaurée par addition "in vitro" du coenzyme, le FAD (34, 116, 128). De même, au cours de la gestation, la concentration cellulaire du FAD diminuant, la D aminoacide oxydase a, là aussi, une activité réduite (140).

.../

D'autre part, l'administration de thyroxine à des rats augmente l'activité D aminoacide oxydasique dans le foie et non dans le rein (129, 116). La castration diminue l'activité de l'enzyme du rein de la Souris (42) et cette activité réaugmente sous l'action de la testostérone.

Enfin, BENDER et KREBS (15) ont noté d'importantes variations saisonnières dans leurs préparations de D aminoacide oxydase de rein de mouton, le maximum d'activité s'observant en août-novembre. Ces variations peuvent vraisemblablement être attribuées à un effet hormonal.

- Des effets du même type ont été rapportés à propos des transminases.

SINITZINA (123) a montré que, dans des tissus de rats carencés en vitamine B_6, la réamination du phénylpyruvate est pratiquement annulée et que les vitesses de transamination sont en moyenne réduites de moitié.

Un régime hypoprotéique diminue l'activité des transaminases chez le rat (8) (un jeûne de 24 heures (79) ne semble pas suffisant pour observer cette diminution).

BARTLETT et GLYNN (13) ont montré un accroîssement de la transaminase glutamate-alanine du foie (non du rein) après administration d'hormone de croissance à des rattes hypophysectomisées ou recevant un régime hypoprotéique. Des témoins entiers ne montrent pas cet effet. Par contre, BEATON et coll. (14) ont rapporté que l'hormone de croissance, si elle accroît la glutamate-alanine transaminase (et non la glutamate-aspartate transaminase) chez de jeunes rats, a l'effet inverse sur des rats adultes.

D'après UMBREIT et TONHAZY (133), l'activité glutamate-aspartate transaminasique reste invariable dans le foie, le rein et le muscle de rats surrénalectomisés traités à la cortisone. Mais EISCHEID et KOCHAKIAN (50) signalent, chez la souris, une augmentation dans le rein et le coeur, et une baisse dans le foie de cet enzyme. GAVOSTO et coll. (57) notent, au contraire, que l'activité

.../

de cet enzyme dans le foie est augmentée après injection de cortisone chez des rats surrénalectomisés. Il en est de même de la glutamate-alanine transaminase (115_a).

Comme on le voit, les actions des hormones sur la désamination oxydative et sur la transamination sort peu cohérentes et difficilement interprétables. Il est probable que traiter des animaux entiers par des hormones ou les soumettre à des conditions nutritionnelles particulières, revient à faire varier à la fois, sans pouvoir les contrôler, un nombre de facteurs indéterminé, si bien que des comparaisons avec des animaux témoins sont délicates et souvent problématiques.

In vitro, on n'a pour ainsi dire jamais trouvé de composé métabolique exerçant une action directe sur ces enzymes à part, évidemment, leurs coenzymes et les composés de structure voisine (34_a). Par contre, quelques influences indirectes ont pû être décelées prouvant l'interférence d'autres secteurs du métabolisme sur les transaminations. Ainsi, dans des homogénats de foie ou de rein, la désamination des L aminoacides par transamination couplée avec la déshydrogénation du glutamate, dépend de la présence de "cofacteurs" tels que l'α-cétoglutarate, le DPN (29).

C'est d'ailleurs dans cette perspective qu'il faut sans doute envisager un contrôle hormonal "in vivo" sur le métabolisme en général par l'intermédiaire du rapport d'équilibre de quelque cofacteurs comme le rapport $\frac{DPN}{DPNH}$ ou $\frac{ATP}{AMP}$ (86, 49).

Notre travail montrera que, dans le cas précis de la désamination oxydative des D aminoacides et de la réamination par transamination des acides cétoniques, une régulation peut, en effet, être observée au sein d'un homogénat de tissu sous l'influence des nucléotides adényliques.

*

* *

.../

CHAPITRE II

METHODES et TECHNIQUES EXPERIMENTALES

A - ETUDE de l'UTILISATION d'un D AMINOACIDE par le RAT.

Méthode -

Trois lots de rats ayant subi deux périodes de jeûne suivies de deux périodes de réalimentation, sont placés, par paires, en cages métaboliques et soumis à un régime synthétique dont l'azote est apporté par un mélange de L aminoacides. Le premier des lots reçoit ce régime pendant toute la durée de l'expérience divisée en 3 périodes : c'est le lot témoin D_1. Un deuxième lot D_2 reçoit le régime pendant la première période, puis on lui fait subir une carence en L phénylalanine en remplaçant 75 % de cet acide aminé par du glycocolle (2ème période). Enfin, 3éme lot, D_3 est le lot où, pendant la période d'essai proprement dite, 75 % de la L phénylalanine est remplacée par la D phénylalanine. Dans la troisième période, tous les rats sont remis au régime synthétique normal. Pendant toute l'expérience, ces 3 lots sont comparés à 3 lots de rats normaux, du même âge, N_1, N_2, et N_3, qui servent de référence.

La croissance des animaux, leurs ingesta et leurs excreta sont suivis journellement.

Technique -

a) Préparation des rats dénutris.

On sépare 2 groupes de 16 rats mâles (souche Commentry) pesant de 50 à 60 g. L'un des groupes reçoit un régime commercial* ad libitum : c'est le groupe des normaux.

Le second groupe, après 6 jours ad libitum, subit deux périodes de jeûne de 7 jours, la première à -75% des ingesta de la

* Voir page suivante.

.../

fin de la période ad libitum ; la seconde à - 40 % seulement des ingesta de la fin de la période de réalimentation, le premier jeûne s'étant révélé trop sévère pour des animaux de cet âge (4 morts).

Pendant la seconde période de réalimentation (6 jours), les rats sont placés par paires, ainsi que les normaux, en cage métabolique (température de l'animalerie 21° ± 1° C). On dispose alors de deux groupes : 16 rats normaux, de poids moyen 150 ± 3,3 g., et 12 dénutris de poids moyen 85 ± 3,6 g.

b) Détail des périodes d'expérimentation.

A la fin des périodes préparatoires, on donne à tous les rats normaux et dénutris divisés en 6 lots (N_1, N_2, N_3, ; D_1, D_2, D_3) le régime synthétique (S), dont la composition est décrite ci-dessous à raison de 12 g. par rat normal et par jour et de 6 g. par rat dénutri et par jour, pendant deux jours. Le poids moyen des dénutris passant de 85 à 80 g. pendant ces deux jours, les ingesta sont portés à 7,5 g.

Ces niveaux d'ingesta (12 g/jour et 7,5 g/jour) seront maintenus durant toute l'expérience et pour tous les régimes.

---

* Le fabricant en donne la composition suivante (en pourcentage) :

Humidité	12,4
Matières minérales	8,0
Protides	20,9
Lipides	4,2
Cellulose	4,3
Matières saccharifiables	46,2
Indosé	4,0
TOTAL	100,0

.../

Après 5 jours de ce régime S, ce qui constitue la prépériode, fait suite la période expérimentale proprement dite (6 jours) :

- les lots N_1 et D_1 (témoins normaux et dénutris, respectivement) continuent à recevoir le régime S,

- les lots N_2 et D_2 reçoivent le régime carencé en L phénylalanine (- Phé),

- les lots N_3 et D_3 reçoivent le régime contenant la D phénylalanine (D Phé).

c) Régime synthétique.

- Le régime synthétique utilisé a la composition globale suivante (en pourcentage) :

Mélange d'aminoacides	15,44
Saccharose	30,0
Amidon de maïs	36,5
Saindoux	11,0
Agar-agar	2,0
Mélange minéral (*)	4,0
Mélange vitaminique	1,0
Citral	0,1
TOTAL	100,04

Ce régime est délayé dans le tiers de son poids d'eau et donné en une seule fois, chaque matin. Les restes sont écartés après avoir été pesés. L'eau de boisson est donnée ad libitum pendant toute l'expérience.

--La composition du mélange d'aminoacides est calquée, en ce qui concerne les acides aminés indispensables, sur celle de la

(*) D'après OSBORNE et MENDEL (103).

.../

caséine (131), mais fortifiée en méthionine, cette protéine étant déficiente en aminoacides soufrés (6). L'azote indifférencié est apporté par l'acide L glutamique et le glycocolle. Le Tableau I donne la composition du régime en aminoacides (g/kg).

- TABLEAU I -

L arginine-HC1 *	7,28
L cystine *	0,51
L histidine *	4,65
L isoleucine **	9,16
L leucine *	13,80
L lysine HC1 *	15,37
L méthionine ***	6,28
L phénylalanine *	7,48
L thréonine ***	7,36
L tryptophane *	2,40
L valine *	10,80
Acide L glutamique x	33,70
Glycocolle *	35,61

* Hoffmann-La Roche
** Société de Chimie Organique et Biologique
*** Nutritional Biochemicals

La seule source d'azote du régime est constituée par le mélange d'aminoacides, soit 21,625 g N/kg. Les dosages directs par la méthode de KJELDAHL ont donné 21,12 g/kg. La différence observée provient sans doute des hétérocycles de l'histidine et du tryptophane (0,795 g N/kg) qui sont mal attaqués lors de la minéralisation.

.../

- Le mélange vitaminique à la composition suivante (2) :

vitamine B_1	30 mg
vitamine B_2	25 mg
vitamine PP	150 mg
vitamine B_6	150 mg
vitamine K	30 mg
vitamine E	400 mg
vitamine B_{12}	0,1 mg
acide pantothénique	50 mg
biotine	1,5 mg
acide folique	0,5 mg
acide p-aminobenzoïque	3,0 mg
inositol	10,0 g
amidon	100,0 g

Une goutte de Vitadone (Vit. A + D) a été donnée à chaque rat le quinzième jour du régime synthétique.

d) Modification du régime.

- Le régime déficient en L phénylalanine (régime " - Phé") ne contient que 25 % du taux de L phénylalanine du régime "S" normal, soit 1,87 g/kg. L'azote manquant est apporté par 2,57 g/kg de glycocolle et un supplément de saccharose, 3,04 g/kg complète la différence de poids. L'apport calorique supplémentaire est évidemment négligeable.

- Dans le régime avec D-phénylalanine (régime "D Phé"), 75 % de la L phénylalanine soit 5,61 g/kg sont remplacés par 5,61 g/kg de l'isomère D.

.../

e) Dosage des excreta.

Les fèces sont recueillies chaque jour, pesées et broyées dans un poids connu de SO_4H_2 1N. Une partie aliquote (1-2 g) est mise à minéraliser dans un matras. Les urines de 24 heures sont recueillies dans une éprouvette contenant 1 ml SO_4H_2 5N. L'analyse d'azote (KJELDAHL) est faite sur une partie aliquote.

B - ETUDE de l'INVERSION des D AMINOACIDES.

Les animaux utilisés sont des rats de souche Commentry de 200 g environ, nourris avec le régime commercial décrit plus haut, auquel est ajouté, deux fois par semaine, un supplément de carottes et de salade.

L'animal est assommé puis décapité. On prélève aussitôt soit les deux reins dont on conserve le cortex, soit le foie. Les organes sont lavés dans un becher contenant du KCl 9‰ glacé. Ils sont ensuite rapidement séchés avec du papier filtre puis pesés (à 50 mg près) et broyés dans 9 volumes d'une solution de saccharose 0,44 M contenant 10 mM de TRIS (*) et 2 mM d'EDTA (**), ajustée à pH 7,2 avec de la soude.

Le broyage est effectué dans un appareil de POTTER en plexiglass dont le piston est adapté à une perceuse d'établi tournant à 600 tours/minute.

Ces opérations doivent être menées avec la plus grande rapidité possible et de manière standard avec des POTTER dont on surveille l'usure, de façon à obtenir un homogénat parfaitement reproductible.

(*) TRIS (hydroxyméthyl) aminométhane.

(**) Ethylène diamine tétraacétate de sodium ou versénate de sodium.

.../

Milieu réactionnel -

Les incubations sont réalisées dans des fioles de Warburg à dégagement. Le compartiment principal renferme, exprimées en concentrations finales :

- tempon PO_4HK_2 - PO_4H_2K pH 7,2	20 mM
- D aminoacide (*)	20 mM
(sauf D phénylalanine : 22,5 mM et D tryptophane : 15 mM)	
- Eventuellement, AMP (**)	10 mM
ATP (***)	10 mM
Succinate de Na	10 mM

L'ampoule latérale contient :

- L glutamate de Na	20 mM
- Benzoate de Na (éventuellement)	1 mM
- Eventuellement AMP ou ATP	10 mM

Toutes ces solutions sont individuellement ajustées au pH 7,2. On ajoute 1 ml d'homogénat (concentration finale 5 %) et, pour compléter au volume (2,0 ml), s'il y a lieu, du saccharose 0,25 M.

MARCHE d'une EXPERIENCE.

1) Les expériences-type d'inversion s'effectuent en 2 étapes successives : oxydation du D aminoacide et transréamination.

- On met à incuber à 37°C les fioles de Warburg pendant 40 minutes à l'air.

- On verse ensuite le contenu de l'ampoule latérale dans le compartiment principal de la fiole et l'incubation est poursuivie à nouveau 40 minutes soit à l'air en présence de benzoate, soit sous atmosphère d'azote en l'absence de ce dernier.

(*) (**) (***) voir page suivante.

.../

Ainsi, l'oxydation du D aminoacide est arrêtée au début de la 2ème phase soit par anaérobiose, soit par l'inhibition de la D aminoacide oxydase par le benzoate.

Nous avons vérifié l'efficacité de cette inhibition par le benzoate (76, 63, 12, 75) : le Tableau suivant donne nos essais d'inhibition de l'oxydation de la D valine par des concentrations variables de benzoate (mesure des consommations d'oxygène à l'appareil de Warburg).

Benzoate (mM)	Inhibition de l'oxydation de la D valine (*) (%)
0,1	58
0,5	79
1,0	97

(*) Milieu réactionnel : homogénat de rein (5 %), D valine (20 mM) PO_4H_2K - $PO_4H\ K_2$ pH 7,2 (20 mM).

Pour la D phénylalanine, 1 mM de benzoate provoque une inhibition du même ordre (98 %).

2) Dans le cas d'une transamination seule, l'expérience se déroule en une seule étape : l'acide cétonique 10 mM est mis directement en présence du L glutamate. L'incubation dure généralement 40 minutes soit à l'air, soit sous azote.

(*) Tous les aminoacides (L ou D) employés proviennent de HOFFMANN-LA ROCHE, à l'exception de la D norvaline (LIGHT and Co) et de la D méthionine (Nutritional Biochemicals Corporation).

(**) L'AMP et l'ATP proviennent de PABST Laboratories.

(***) Nous remercions très vivement G. FAUCONNEAU d'avoir bien voulu contrôler à plusieurs reprises les préparations d'ATP que nous avons utilisées. Elles contiennent : 93,1 % d'ATP, 2,49 % d'ADP et 0,49 % d'AMP.

.../

ANALYSE des PRODUITS REACTIONNELS.

A la fin de chaque étape de l'expérience, on arrête les réactions avec un volume (2,0 ml) d'acide perchlorique (10 %) glacé. Les opérations suivantes s'effectuent entre 0° et -5°C : filtration des protéines, neutralisation du filtrat par KOH 2N et élimination du perchlorate de potassium.

Nous avons parfois utilisé l'acide trichloracétique (10 %). Les solutions devant être chromatographiées, on élimine cet acide par des extractions fractionnées avec de l'éther éthylique. Trois fois 5 ml d'éther suffisent ; mais en plus de l'acide trichloracétique, d'autres substances sont éliminées notamment les acides cétoniques. C'est pourquoi, dans la presque totalité des cas, nous avons préféré utiliser l'acide perchlorique.

Chaque expérience comporte 6 fioles de Warburg de façon qu'à la fin de chaque étape les dosages puissent être faits en triple.

- Séparation et dosage des aminoacides.

Pratiquement, le problème technique est relativement simple : il s'agit de séparer l'aminoacide de départ (le plus souvent la phénylalanine ou la valine) du groupe acide glutamique, acide aspartique et alanine.

Pour ce faire, on dépose sur papier Whatman N° 1 une quantité connue (0,03 à 0,06 umole) de l'aminoacide à analyser. On fait une chromatographie descendante pendant 8-14 heures dans l'éthanol 77°, ou le mélange n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5) ; dans quelques cas, le mélange n-butanol saturé d'eau/acide (95/5) a été utilisé. Le tableau II donne pour chacun de ces solvants les R_f des aminoacides employés.

Les taches sont révélées par vaporisation d'une solution de ninhydrine à 0,3 % dans l'éthanol à 75 %. On vaporise d'abord une petite quantité de cette solution et l'on place le chromatogramme

.../

dans une étuve ventilée à 80°C afin de localiser les taches. Ensuite, on vaporise une deuxième fois, abondamment, de chaque côté du papier, de façon que celui-ci soit imbibé d'une manière très homogène, et le chromatogramme est laissé 25 minutes dans l'étuve ventilée à 80°C.

(Tableau II)

Il nous paraît nécessaire, pour obtenir des taches nettes, de coloration reproductible sur un fond parfaitement blanc, d'employer un vaporisateur à grand débit (un pistolet à peinture fonctionnant à l'air comprimé), d'éviter l'exposition des chromatogrammes à la lumière artificielle ainsi qu'au soleil et d'employer une étuve ventilée pour éviter des surchauffes locales. D'autre part, au-dessus d'une quantité de 0,06 umole d'aminoacide, les colorations obtenues ne sont plus proportionnelles à la concentration de l'aminoacide et deviennent difficilement reproductibles.

Chaque tache d'aminoacides est découpée et placée, après avoir été coupée en petits morceaux, dans un tube à essai. On ajoute 4 ml d'éthanol à 75° contenant 0,2 mg de SO_4Cu, 5 H_2O. On agite quelques instants et on lit la coloration au spectrophotomètre à 540 mμ (59), que l'on compare à une courbe étalon tracée pour chaque expérience à partir d'une gamme de quantités connues d'aminoacides (5 ou 6). Chaque élément de cette gamme a subi les mêmes traitements que les points expérimentaux et sont chromatographiés sur le même chromatogramme. En outre, chaque chromatogramme est fait en double. Dans ces conditions, la précision statistique (trois dosages et deux chromatogrammes, soit 6 points) est de l'ordre de 3 à 5 %, suivant l'aminoacide.

Nous donnons, dans le Tableau III la sensibilité de quelques aminoacides à la réaction à la ninhydrine.

(Tableau III)

.../

TABLEAU II

R_f des aminoacides.

Aminoacides	R_f pour différents solvants		
	Ethanol 77°	n butanol - Acide acétique - eau (4 - 1 - 5)	n butanol saturé d'eau - acide acétique (95 - 5)
Acide glutamique	0,35 (0,31)*	0,19	0,04
Acide aspartique	0,25 (0,19)	0,14	0,01
Alanine	0,58 (0,60)	0,27	0,08
Phénylalanine	0,68 (0,85)	0,58	0,26
Tyrosine	0,59 (0,51)	0,32	0,13
Valine	0,65 (0,78)	0,48	0,21
Nor-valine	0,63 (0,80)	-	-
Leucine	0,74 (0,84)	0,64	0,35
Tryptophane	0,53 (0,75)	0,51	0,15
Méthionine	0,70 (0,81)	0,46	0,19
Lysine	0,61 (0,81)	0,08	0,01

* Entre parenthèses sont donnés pour comparaison les R_f obtenus par BLOCK et BOLLING pour le solvant correspondant (24).

.../

TABLEAU III

Amino-acides	Densité optique x 1.000 de l'éluat alcoolique correspondant à 0,05 µmole d'aminoacide
Acide glutamique	291
Acide aspartique	160
Alanine	291
Phénylalanine	145
Tyrosine	141
Valine	294
Nor-Valine	279
Leucine	272
Tryptophane	141
Méthionine	248
Lysine	241
Blanc	$4 \pm 0,9$ *

*La valeur moyenne ($\pm \sigma_m$) de 6 blancs est donnée à titre d'indication.

Le Tableau IIIa montre 2 dosages de la phénylalanine par notre méthode : des quantités connues de phénylalanine sont ajoutées à l'homogénat et traitées de la manière indiquée plus haut. L'extrapolation au 0 (par la phénylalanine ajoutée) indique une densité optique de l'ordre de 0,008, ce qui montre la faible quantité de phénylalanine apportée dans l'homogénat.

TABLEAU IIIa

Phénylalanine (µ M)	D.O. x 1.000	
	Dosage I	Dosage II
0,030	90	92
0,045	129	129
0,060	168	169
0,075	204	205
0,090	245	246

*

* *

.../

- Séparation et dosage des acides cétoniques.

Les mêmes solutions servent à la séparation des aminoacides et des acides cétoniques. Dans le cas de ceux-ci, la défécation est exclusivement faite avec l'acide perchlorique. On dépose entre 0,06 et 0,12 umole de l'acide α-cétonique à doser sur papier Whatman N° 1, et l'on fait une chromatographie descendante. Le solvant utilisé est le mélange butanol/acide acétique/eau (4/1/5). Nous avons essayé le mélange butanol saturé d'eau/acide acétique (95/5).

Le Tableau IV donnant les R_f dans ces 2 solvants de quelques acides cétoniques, montre que l'acide phénylpyruvique donne une seule tache nettement différente de celles des acides α-cétoglutarique, oxalacétique et pyruvique.

TABLEAU IV

R_f des acides cétoniques.

Acides αcétoniques (Sels de Na)	R_f pour les solvants	
	Butanol-/ acide acétique/ eau (4 / 1 / 5)	Butanol saturé d'eau/ acide acétique (95 / 5)
Acide α-cétoglutarique	0,26	0,08
Acide oxalacétique	(0,46 (0,10	(0,24 (0,00
Acide pyruvique	(0,51 (0,19	(0,28 (0,08
Acide phénylpyruvique	0,83	0,76

On pulvérise sur le chromatogramme une solution de semi-carbazide (0,1 % dans de l'acétate de sodium 0,15 %) (90). Après un chauffage de 5 minutes à 80°C, on repère en lumière ultra-violette les taches de semicarbazones que l'on découpe comme il est fait pour les taches d'aminoacides.

On élue avec 3 ml de la solution de semi-carbazide additionnés de 2 ml d'eau. On abandonne 2 heures à la température du laboratoire et on lit au spectrophotomètre à 250 mμ l'absorption des semicarbazones. La précision statistique pour le phénylpyruvate est de 5 % environ.

Nous avons essayé un dosage des acides cétoniques par action de la 2,4 - dinitrophénylhydrazine. Pour cela, on ajoute aux taches de semicarbazones, obtenues comme précédemment, une solution de 2,4 - dinitrophénylhydrazine 0,03 % dans HCl 0,5 N. Après 30 minutes on ajoute de la potasse et on lit les colorations à 450 mμ au spectrophotomètre (132). On obtient, dans ces conditions, des blancs de valeur élevée et la précision des mesures est moindre que dans le cas des semicarbazones.

- Dosage de la L valine dans un mélange des 2 isomères D et L.

En fin des expériences d'inversion, en vue d'apprécier la quantité de D aminoacide transformée en L aminoacide, nous avons préparé la D aminoacide oxydase à partir d'une poudre acétonique de rein de mouton suivant la technique de NEGELEIN et BROMEL (99) jusqu'au stade de la première précipitation au sulfate d'ammonium.

On fait agir cette préparation sur la solution des 2 isomères à analyser et la consommation d'oxygène obtenue permet d'apprécier la quantité de D aminoacide présente. Deux chromatographies avant et après action de la D aminoacide oxydase, permettent par différence de recouper cette appréciation, et la dernière chromatographie permet de doser directement le L aminoacide formé, non attaqué par la préparation.

.../

Ce dosage enzymatique a été effectué pour la valine. La phénylalanine ne peut être dosée par ce procédé : son oxydation par la D aminoacide oxydase n'est pas complète (55), le phénylpyruvate inhibant la réaction.

Le Tableau V montre, pour la valine, un essai de dosage de la D et de la L valine dans un mélange racémique.

TABLEAU V

Dosage d'un mélange de DL valine au moyen de la D amioacide oxydase (DAAO)

aline épart)	Valine retrouvée par chromatographie. (mM)	D valine présente d'après la consommation d'O_2 par la DAAO (mM)	L valine présente (chromatographie après action de la DAAO) (mM)	Somme D + L
0	40,4	20,0	19,7	39,7

-:-:-:-:-:-:-:-:-

DEUXIEME PARTIE

REGULATION de l'INVERSION des D AMINOACIDES

CHAPITRE I

OBSERVATIONS sur l'UTILISATION "IN VIVO" des AMINOACIDES. INFLUENCE de l'ETAT NUTRITIONNEL.

-ooo-

La partie proprement nutritionnelle de nos recherches sera exposée dans ce chapitre. Elle s'efforce de répondre à la question suivante : comment un régime comportant un D aminoacide est-il utilisé par un organisme en état d'anabolisme azoté accru ?

Pour cela, les effets de 3 régimes synthétiques - contenant soit de la L, soit de la D phénylalanine, ou bien déficient en cet aminoacide - ont été comparés à la fois sur des rats normaux et sur des rats dénutris, en suivant la croissance pondérale et l'évolution des bilans azotés.

Ces régimes ont été donnés pendant une période de 6 jours, précédée et suivie d'une pré- et d'une post-période de 5 à 6 jours, respectivement au cours desquelles tous les rats reçoivent le régime témoin contenant de la L phénylalanine.

Les rats dénutris pèsent, au début de l'expérience, environ deux fois moins que les normaux (80 et 153 g. en moyenne) et leurs ingesta sont réduits (7,5 et 12 g.). Nous envisagerons en conséquence les valeurs des gains de poids et des bilans azotés relativement au poids des rats et aux ingesta.

*

* *

.../

I - UTILISATION d'un MELANGE de L AMINOACIDES.

Le régime "S" contenant les aminoacides indispensables au Rat, exclusivement sous la forme L, sert de régime témoin. Il est donné à tous les rats normaux (N_1, N_2, N_3) et dénutris (D_1, D_2, D_3) pendant la prépériode et la postpériode. Seuls les lots de normaux N_1 et de dénutris D_1 le reçoivent pendant la période expérimentale.

Au cours de la prépériode, les 16 rats normaux (N_1, N_2,et N_3) gagnent de 1,6 à 1,8 g/rat/jour, et les dénutris un peu plus : de 1,7 à 2,2 g/rat/jour. Rapportés au poids des animaux et aux ingesta $\frac{\Delta P \times 100}{P}$ et $\frac{\Delta P \times 100}{N_2}$ (fig. 1), les gains de poids des dénutris sont environ deux fois ceux des normaux.

Les bilans azotés sont stables chez les normaux pendant cette prépériode sauf peut-être le premier jour (Tableau I). Ceux des dénutris, au contraire, augmentent régulièrement bien que les ingesta soient constants, et les différences avec la valeur du 5ème jour sont toutes statistiquement très significatives ($P < 0,01$) ; par la suite, le bilan reste stable pour les rats D_1 : 50 mg d'azote/rat/jour pendant le reste de l'expérience (12 jours).

TABLEAU I

Bilans journaliers pendant la prépériode.

Jours de la pré-période	Azote retenu par jour ± M (mg/rat)	
	Normaux (16 rats)	Dénutris (12 rats)
1	42 ± 7,2	15 ± 4,2
2	63 ± 8,6	29 ± 4,7
3	47 ± 10	35 ± 2,2
4	55 ± 5,6	37 ± 3,6
5	58 ± 9,6	52 ± 2,6

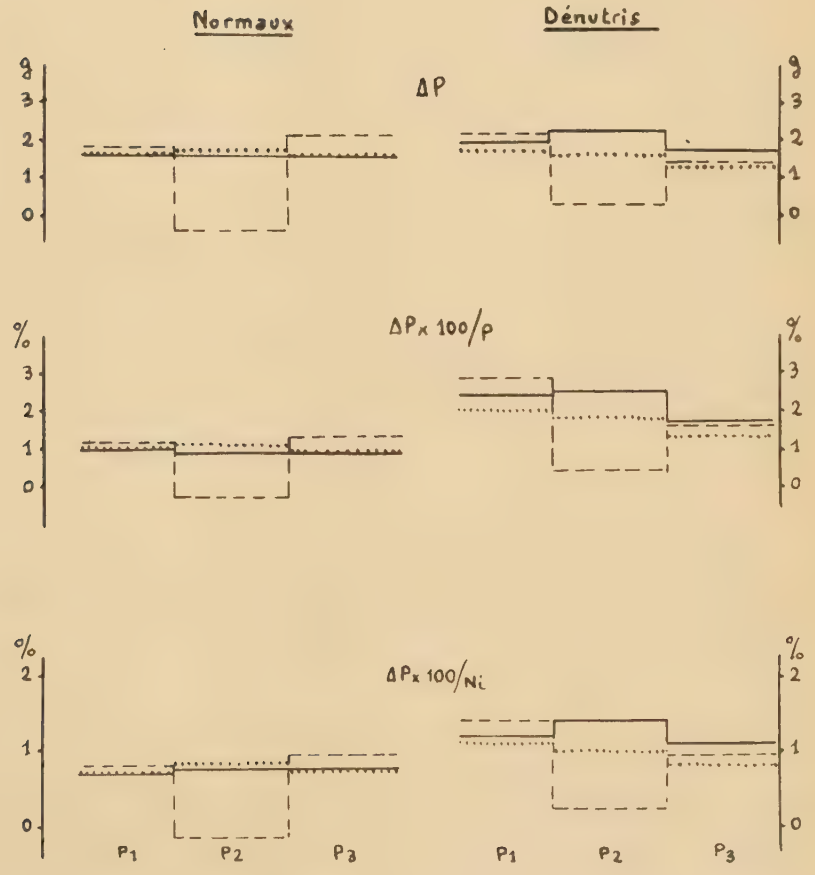
Fig. 1 - Variations de poids des rats normaux et dénutris pour la prépériode (P_1), la période expérimentale (P_2) et la post-période (P_3).

ΔP : Gain de Poids moyen (g/rat/jour).
$\Delta P \times 100/P$: Gain de poids relatif moyen
$\Delta P \times 100/N_i$: Gain de poids moyen rapporté à l'azote ingéré (mg).

——— Lots témoins, normaux et dénutris

------ Lots carencés en phénylalanine pendant la période P_2.

..... Lots recevant la D phénylalanine pendant la période P_2.



Les 6 rats normaux N_1 ont une croissance parfaitement régulière durant toute l'expérimentation (fig. 1). Il n'en est pas strictement de même des dénutris D_1 (2 rats) puisque leur croissance semble se ralentir en fin d'expérience, mais cependant sans signification statistique.

Les ingesta sont constants et les bilans azotés se maintiennent à des niveaux très stables : 67 et 65 mg d'azote/j pour les normaux et 50 mg d'azote/j pour les dénutris (fig. 2).

Deux remarques peuvent être faites sur le comportement des rats recevant le régime "S".

- La prépériode est en fait, pour les dénutris, une période de stabilisation des bilans. Ces animaux avaient auparavant subi une période de réplétion ad libitum après un jeûne sévère (cf. chapitre "Techniques"). La mise au régime synthétique et une ration minimum * sont des raisons probablement suffisantes pour créer des conditions nutritionnelles peu favorables. Une accoutumance à ces conditions est donc nécessaire.

- On observe certains décalages entre les gains de poids et les bilans azotés : pour des croissances analogues les rétentions azotées sont moindres chez les dénutris que chez les normaux. En réalité, il s'agit là de deux appréciations qui n'ont pas la même dimension, la croissance étant un phénomène global dont les mouvements d'azote ne sont qu'un aspect.

Ces remarques faites, il apparaît que le régime "S" est bien utilisé par les rats normaux et par les dénutris après la prépériode. Relativement à leur poids, ceux-ci l'utilisent mieux que les normaux.

---

* Les dénutris, pendant les 17 jours de l'expérience, ingèrent la totalité de leur ration aussitôt qu'elle leur est donnée. Les normaux, au contraire, n'ingèrent la leur que la nuit suivante.

.../

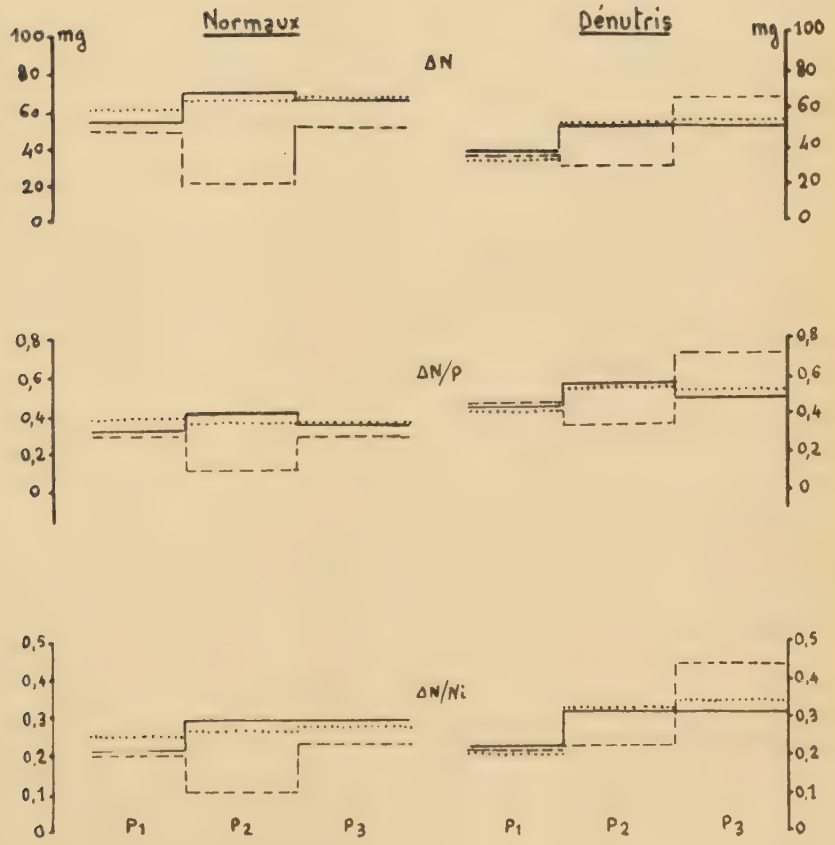
Fig. 2 - Bilans azotés moyens des rats normaux et dénutris pour la pré-période (P_1), la période expérimentale (P_2) et la post-période (P_3).

ΔN : Azoté retenu (mg/rat/jour).
$\Delta N/P$: Azote retenu par gramme de rat et par jour.
$\Delta N/N_i$: mg d'azote retenu par mg d'azote ingéré.

——— Lots témoins, normaux et dénutris

------ Lots carencés en phénylalanine pendant la période P_2.

..... Lots recevant la D phénylalanine pendant la période P_2.



II - UTILISATION d'un REGIME DEFICIENT en PHENYLALANINE.

La suppression de 75 % du taux de L phénylalanine (régime " -Phé ") amène, chez les 6 rats normaux N_2, une nette perte d'appétit (14 %), accompagnée d'un brusque arrêt de croissance (fig. 1) et de la chute de la rétention azotée, laquelle est réduite au tiers de celle des témoins N_1 (fig. 2). Ces variations, par rapports aux pré- et postpériodes ainsi que par rapport aux témoins N_1, sont statistiquement très significatives ($P < 0,01$).

Lors du retour au régime "S" (post-période), les animaux ne recouvrent pas entièrement leur appétit antérieur ; ils regagnent pourtant un peu plus de poids que les témoins N_1. Le bilan azoté revient à sa valeur initiale.

Chez les rats dénutris D_2, le régime " -Phé " provoque aussi, de manière très significative, une diminution de l'appétit (18 %), de la croissance (fig. 1) et du bilan azoté (fig. 2) (par rapport au dernier jour de la période, ou par rapport aux témoins D_1 pour la période expérimentale). Le retour au régime "S" (post-période) coïncide avec une reprise de l'appétit, bien que la nourriture offerte ne soit plus totalement ingérée. Le gain de poids est voisin de celui des normaux. La rétention d'azote, par contre, est très importante, passant de 29 à 64 mg d'N/rat/jour.

Le régime déficient en phénylalanine est donc mal supporté par les rats normaux et dénutris. Les effets que nous avons notés sont classiques : diminution de l'appétit, arrêt de croissance, chute de la rétention azotée. A eux seuls, d'ailleurs, les effets sur l'appétit sont caractéristiques d'une carence en aminoacide indispensable (36, 54, 111, 115, 125).

Cependant, la comparaison entre normaux et dénutris, figurée dans le Tableau II, pour le régime " -Phé ", est nettement en faveur de ceux-ci. On peut même remarquer (fig. 2) que les bilans relatifs des dénutris carencés sont aux niveaux de ceux des normaux recevant le régime "S" témoin. Cela confirme le fait connu que la

.../

- TABLEAU II -

Utilisation du régime déficient en phénylalanine par les rats normaux et dénutris :

Variations de poids (ΔP) et bilans azotés (ΔN), rapportés au poids des rats (P) et à l'azote ingéré (N_i)

($\pm \sigma_m$)

	$\frac{\Delta P}{(g./j./rat)}$	$\frac{\Delta P}{P} \times 100$	$\frac{\Delta P}{N_i} \times 100$	$\frac{\Delta N}{(mgN/j/rat)}$	$\frac{\Delta N}{P}$	$\frac{\Delta N}{N_i}$
Rats N_2 (6)	- 0,33 $\pm$ 0,18	- 0,22 $\pm$ 0,13	- 0,16 $\pm$ 0,11	+ 21 $\pm$ 6,2	+ 0,15 $\pm$ 0,044	+ 0,10 $\pm$ 0,038
Rats D_2 (4)	+ 0,33 $\pm$ 0,13	+ 0,38 $\pm$ 0,15	+ 0,25 $\pm$ 0,10	+ 29 $\pm$ 3,0	+ 0,34 $\pm$ 0,051	+ 0,22 $\pm$ 0,031

valeur biologique d'une protéine (136, 4, 5) ou d'un mélange d'aminoacides (65, 126, 127) est augmentée après une dénutrition.

Il apparaît donc que le besoin des deux groupes de rats n'est pas le même vis-à-vis de la phénylalanine et qu'une dénutrition comme celle que nous avons pratiquée, permet de mettre en évidence la relativité de ce besoin. (Tableau II)

III - UTILISATION d'un REGIME CONTENANT de la D PHENYLALANINE.

Chez les 4 rats normaux N_3, le remplacement de 75 % de la L phénylalanine par l'isomère D (Régime "D Phé") n'affecte en rien ni l'appétit, ni la croissance, ni le bilan azoté (fig. 1 et 2).

Chez les dénutris D_3 (6 rats), le régime "D Phé" n'a pas d'effet non plus sur l'appétit et le bilan azoté. Les gains de poids sont, pendant toute l'expérience, un peu plus faibles que ceux des rats témoins D_1 ; cependant, l'évolution des gains des rats D_3 est exactement superposable à celle des rats D_1, que le régime contienne de la L ou de la D phénylalanine.

L'équivalence des 2 isomères de la phénylalanine pour la croissance du Rat a déjà été rapportée (7, 113, 115, 141, 145) et nos résultats sont tout à fait en accord avec ces données.

On peut remarquer dans le Tableau III que la comparaison des variations de poids et des rétentions d'azote rapportées au poids des rats et aux ingesta est en faveur des dénutris. Cela est particulièrement significatif pour les bilans relatifs au poids des rats.

(Tableau III)

.../

- TABLEAU III -

Utilisation du régime "D Phé" par les rats normaux et dénutris.
Variations de poids ΔP et bilans azotés ΔN rapportés au poids P des rats
et à l'azote ingéré N_i ($\pm \sigma_m$)

RATS	ΔP (g./j./rat)	$\frac{\Delta P}{P} \times 100$	$\frac{\Delta P}{N_i} \times 100$	ΔN (mgN/j/rat)	$\frac{\Delta N}{P}$	$\frac{\Delta N}{N_i}$
N_3 (4)	+ 1,8 ± 0,15	1,15 ± 0,13	0,75 ± 0,05	65 ± 5,0	0,38 ± 0,026	0,27 ± 0,035
D_3 (6)	+ 1,6 ± 0,10	1,79 ± 0,22	1,01 ± 0,07	50 ± 5,5	0,54 ± 0,060	0,34 ± 0,047

On peut donc considérer que l'état nutritionnel des rats influe sur l'utilisation qu'ils font des divers régimes que nous avons employés. Cela, nous l'avons vu, est particulièrement net lorsque le régime a une faible valeur biologique (cas du régime déficient en phénylalanine) : en effet les dénutris l'utilisent deux fois mieux que les normaux.

Dans le cas d'organismes dénutris on sait, et nous l'avons vérifié, que le catabolisme azoté est réduit (89, 98, 147) et qu'alors le rendement d'utilisation d'un régime est augmenté. Or, l'azote est principalement excrété, chez les Mammifères, sous forme d'urée dont les deux atomes d'azote proviennent, l'un de l'acide aspartique (108 a), par l'intermédiaire de l'argininosuccinate et de l'arginine ; l'autre, des divers aminoacides, surtout par l'action combinée des transaminases et de la glutamate deshydrogénase (transdésamination de BRAUNSTEIN (28, 29)). Une réduction éventuelle du catabolisme azoté peut donc être envisagée comme la conséquence du jeu des transaminases et de la glutamate déshydrogénase en faveur des transréaminations. De plus, cette réduction du catabolisme dépendant uniquement de l'état de nutrition devra s'observer quel que soit le régime. En particulier, lorsqu'un D aminoacide est donné, l'acide cétonique correspondant pourra être rapidement réaminé, et l'efficacité du régime sera en conséquence très augmentée. C'est en effet ce que nous avons observé.

Il serait certes intéressant d'envisager avec d'autres D aminoacides des expérimentations analogues à celle que nous avons tentée avec la D phénylalanine. La D valine, notamment, qui est un bon substrat de la D aminoacide oxydase (73) et qui, dans un régime, est incapable de remplacer efficacement la L valine (142), paraît un cas particulier très intéressant. Mais le prix prohibitif des L aminoacides nous a interdit jusqu'à présent de répéter ces expériences.

Néanmoins, d'après nos résultats, dans le cas de la D phénylalanine, nous sommes amenés à considérer très précisément un effet

.../

de l'état de nutrition sur la transréamination des acides cétoniques.

Nous verrons, plus loin, qu'effectivement la transréamination peut, dans des conditions définies, être sujette à une régulation d'ordre biochimique permettant une inversion des D aminoacides variable dans de très larges limites.

*

* *

CHAPITRE II

CONDITIONS de l'INVERSION des D AMINOACIDES

Nous traiterons dans ce chapitre de l'inversion des D aminoacides telle que nous l'avons observée dans des homogénats de rein de Rat dans les conditions expérimentales les plus simples (inversion témoin).

Le premier point que nous aborderons sera la mise en évidence de la transformation d'un isomère D en isomère L. Nous envisagerons ensuite chacune des deux réactions en jeu, désamination oxydative et transréamination. Nous comparerons enfin l'inversion de quelques D aminoacides.

I. - TRANSFORMATION d'un D AMINOACIDE en son ISOMERE L.

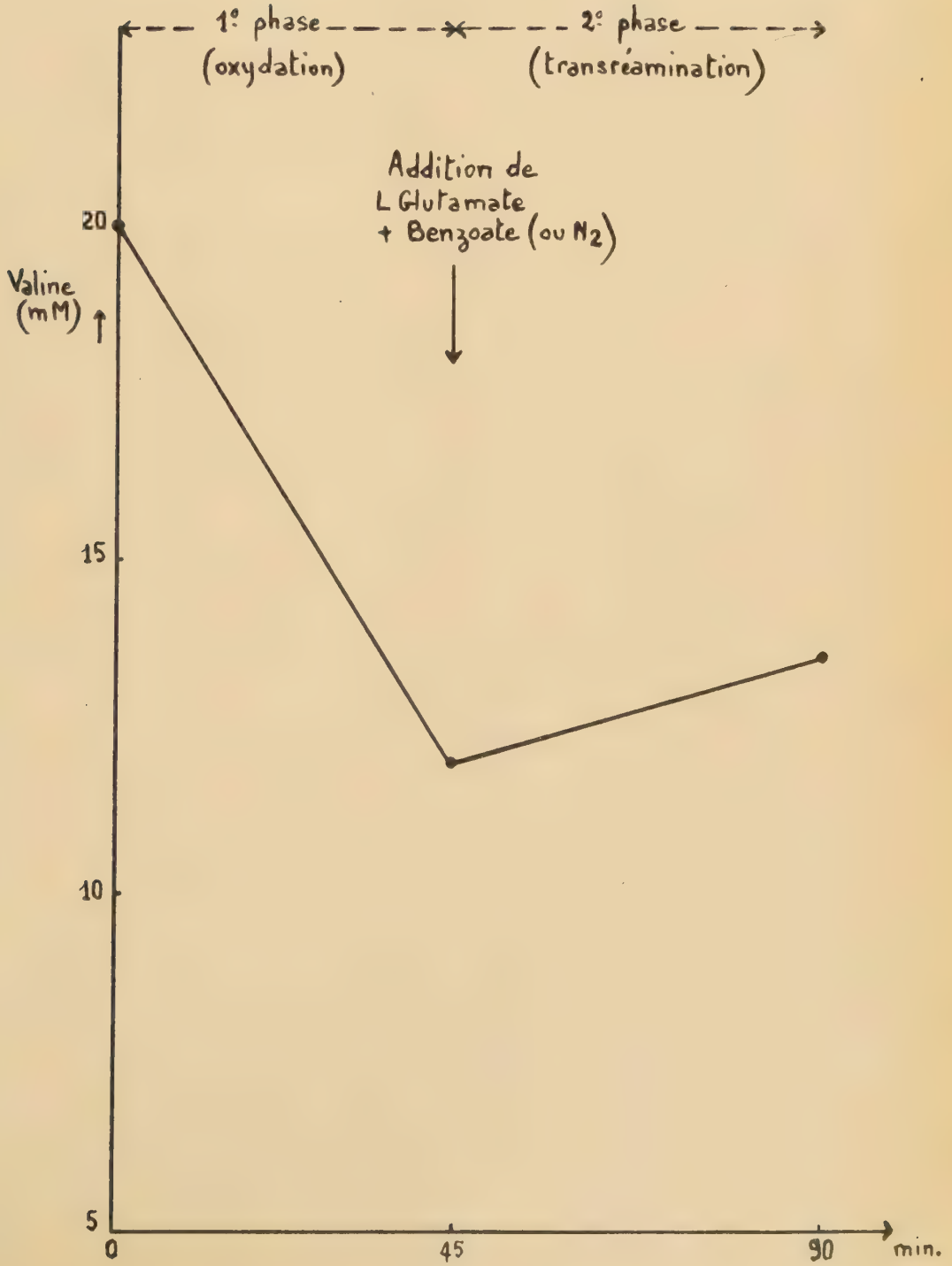
L'inversion des D aminoacides a été réalisée en deux phases successives. Pendant la première (phase d'oxydation) le D aminoacide disparaît et, pendant la seconde (phase de transréamination), une resynthèse de cet aminoacide a lieu en présence de L glutamate. La figure 1 montre ce fait pour la valine.

Une analyse de chaque isomère a été faite au début de l'inversion et à la fin de chacune des deux phases. Des résultats de cette analyse (tableau I), il ressort les points suivants :

- La D valine disparaît pendant la première phase sans donner lieu à une racémisation simultanée ;
- La somme L + D valine trouvée correspond bien à chaque instant (à 3 % près) au dosage de la valine totale ;
- La valine apparue en fin d'expérience est donc bien intégralement de la L valine.

.../

Fig. 1 - Inversion de la D valine dans l'homogénat de rein.



Inversion de la D valine (20 mM) par un homogénat de rein.
Analyse des isomères D et L (dosages en triple).
Ière phase : oxydation de 45 minutes à l'air, à 37°C.
2ème phase : transréamination de 50 minutes, sous azote, à 37°C, en présence de 20 mM de L glutamate.

Dosages	Valine retrouvée (mM)			Valine inversée (mM)
	Au temps zéro	Après oxydation (a)	Après transréami- (b)	(b) - (a)
I) Valine totale L + D (par chromatographie)	-	12,0	13,6	1,6
II) D valine (D aminoacide oxydase)	20,4	12,0	11,8	-
III) L valine (chromatographie après action de la D aminoacide oxydase)	0	0	1,6	1,6
Somme L + D, lignes II + III	20,4	12,0	13,4	-

II. - PREMIERE PHASE de l'INVERSION : DESAMINATION OXYDATIVE.

A la disparition du D aminoacide observée pendant la première phase de l'inversion correspond une apparition parallèle de l'acide cétonique. Ainsi, pour une disparition en 40 minutes de 7,1 mM de D phénylalanine, on obtient 6,1 mM de phénylpyruvate. (tableau II.). Le déficit observé, qui d'ailleurs est sans signification statistique, peut vraisemblablement provenir d'une faible décarboxylation de l'acide cétonique au sein de l'homogénat. Nous verrons en effet que ce déficit ne s'accroît plus si l'on poursuit l'incubation en atmosphère d'azote.

Il semble bien que ce soit là la seule réaction secondaire : en effet l'absence de transamination pendant cette première phase a été montrée plus haut.

Dans nos conditions expérimentales, par conséquent, la première phase de l'inversion est une désamination oxydative, pratiquement quantitative.

III. - DEUXIEME PHASE de l'INVERSION : TRANSAMINATION.

1°) L'acide cétonique obtenu par désamination oxydative est réaminé pendant la deuxième phase en présence de L glutamate. En particulier, la resynthèse de phénylalanine (tableau II) correspond exactement au phénylpyruvate disparu : 2,5 mM et 2,2 mM. Rappelons que, dans le cas de la valine (tableau I), l'aminoacide resynthétisé est uniquement de la forme L.

2°) La présence de l'acide cétonique et d'un donneur de groupe NH_2, en l'occurence l'acide L glutamique, est indispensable. En effet, en l'absence de ce dernier, la resynthèse de phénylalanine est nulle. Il en est de même si l'on bloque la fonction du phénylpyruvate en ajoutant un excès de semicarbazide. Le tableau III montre ces faits.

Toutes ces caractéristiques font bien de cette réaction une transréamination.

.../

- Tableau II -

Evolution de la phénylalanine et du phénylpyruvate lors de l'inversion de la D phénylalanine (homogénat de rein). Oxydation de 40 minutes à l'air (37°C) suivie d'une transréamination de 40 minutes sous azote (37°C) en présence de L glutamate (20 mM). (Expériences (3) faites en présence d'ATP, 10 mM).

mM ± [illegible] m	Temps 0	Après oxydation	Après Transréamination	Phénylalanine transréaminée
I) Phénylalanine restant	22,1 ± 0,1	15,0 ± 0,27	17,5 ± 0,35	d'après la phénylalanine 2,5 ± 0,44
II) Phénylpyruvate apparu	0	6,1 ± 0,64	3,9 ± 0,32	d'après le phénylpyruvate 2,2 ± 0,46
Somme I + II	22,1	21,1 ± 0,91	21,4 ± 0,67	

- Tableau III -

Effet du L glutamate et de la semicarbazide sur la deuxième phase de l'inversion de la D phénylalanine. Homogénats de rein, 37°C/ Oxydation de 22,5 mM de D phénylalanine (40 minutes à l'air) suivie d'une transréamination en présence de benzoate (1 mM) à l'air, pendant 40 minutes.

Addition au début de la 2ème phase	Phénylalanine resynthétisée (mM)
0	+ 0,3
L glutamate (20 mM)	+ 1,8
L glutamate (20 mM) + semicarbazide (100 mM)	+ 0,1

3°) Il nous a paru intéressant de comparer l'efficacité de la transréamination avec les 3 donneurs usuels de groupe NH_2 que sont le glutamate, l'aspartate et l'alanine.

La figure 2 donne les valeurs obtenues pour la synthèse de phénylalanine (traits pleins) et de méthionine (pointillés) dans ces diverses conditions, les transréaminations respectives en présence de glutamate étant prises pour 100.

Bien qu'il y ait quelque différence entre la phénylalanine et la méthionine, il est clair que dans ces deux cas, le L glutamate est un peu plus efficace que le L aspartate et environ deux fois plus que la L alanine. Cela confirme tout à fait le rôle privilégié du glutamate noté par BRAUNSTEIN (28) pour les transaminations dans les tissus des mammifères.

4°) La phase de transréamination s'effectue après blocage du fonctionnement de la D aminoacide oxydase, soit par un inhibiteur, le benzoate, soit par une atmosphère d'azote.

Comme l'indique le tableau IV, ces deux façons de procéder sont équivalentes.

IV. - INVERSION de QUELQUES D AMINOACIDES.

1°) Inversion par des homogénats de rein.

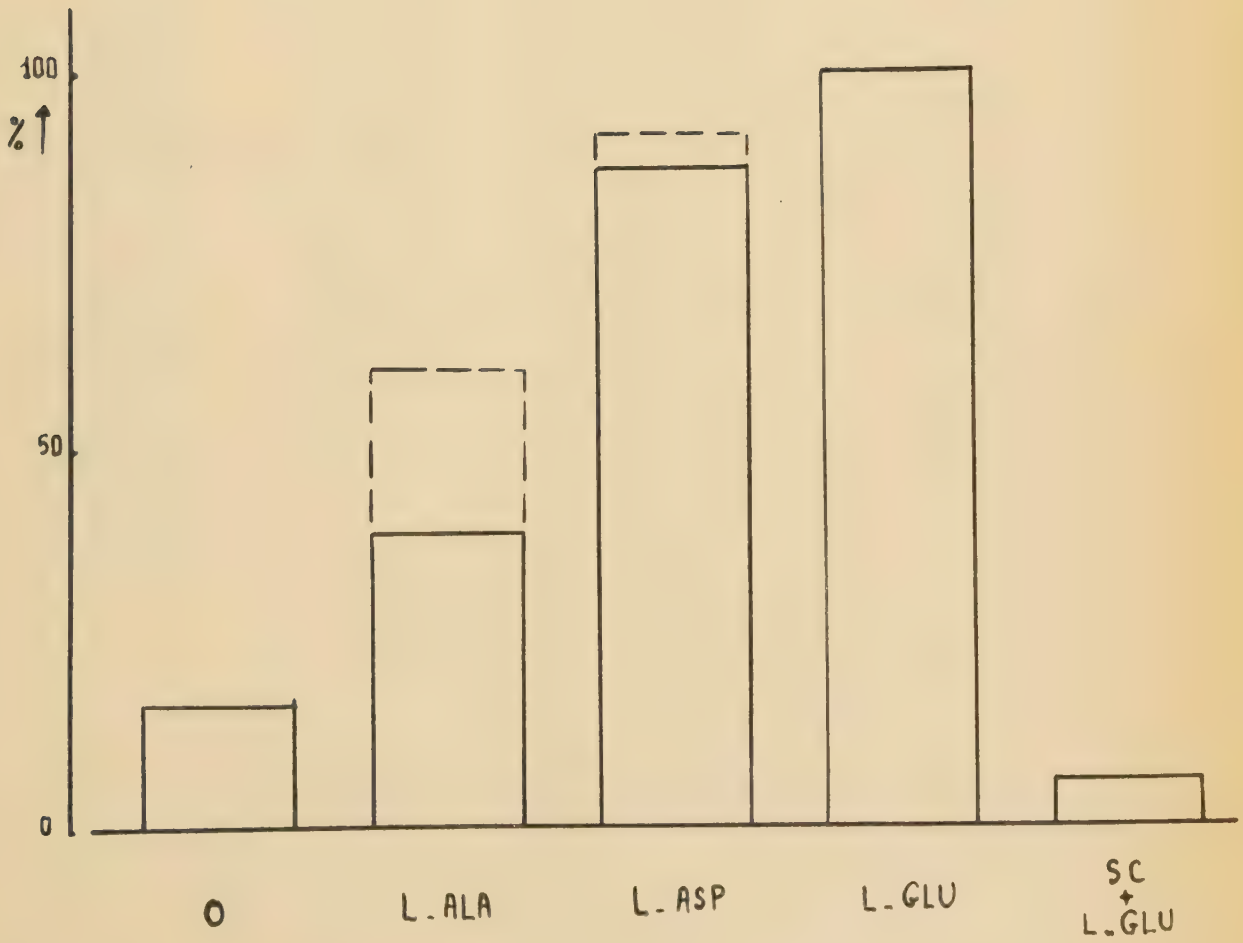
Des inversions de divers D aminoacides ont été effectuées dans nos conditions standard (oxydation de 40 minutes à l'air à 37°C suivie d'une transréamination de 40 minutes à l'air à 37°C, en présence de L glutamate 20 mM, et de benzoate 1 mM). Le tableau V présente ces résultats.

On peut constater que dans le rein, certains acides aminés s'oxydent bien (phénylalanine, tryptophane, valine, méthionine), que d'autres s'oxydent peu (leucine) ou pas (lysine). Nous avons résumé ces faits dans le tableau VI, qui classe les D aminoacides selon leur pourcentage d'oxydation dans nos conditions.

.../

Fig. 2 - Influence du donneur de groupe NH_2 sur la transréamination des acides cétoniques lors de l'inversion de la D phénylalanine (traits pleins) et de la D méthionine (traits discontinus). Inhibition par la semicarbazide (Sc).

(La valeur donnée par le glutamate est prise pour 100).



- TABLEAU IV -

Transréamination en présence de benzoate (1 mM) ou d'une atmosphère d'azote.
Homogénats de rein. Transréamination (40 minutes à 37°C) en présence de L glutamate (20 mM) après une oxydation préalable (40 minutes à 37°C) des D aminoacides.

Aminoacide à inverser	Aminoacide inversé (mM $\pm$ σ_M) (Nb.d'expér.)	
	en présence de benzoate	en atmosphère d'azote
D phénylalanine	1,9 $\pm$ 0,19 (11)	1,8 $\pm$ 0,52 (4)
D valine	1,1 $\pm$ 0,18 (6)	1,2 $\pm$ 0,24 (3)
D nor-valine	0,9 $\pm$ 0,22 (3)	1,1 $\pm$ 0,10 (2)

Inversion des D aminoacides dans les conditions standard.

Homogénats de rein et de foie

Aminoacide Nombre d'expériences	Aminoacide (mM) ± σ M					Tissu
	Avant expérience a	Après oxydation b	Après transréamination c	Inversé (c - b)	P*	
D phénylalanine (11)	22,5	11,8 ± 0,19	13,7 ± 0,13	+ 1,9 ± 0,19	0,01	Rein
D phénylalanine (4)	22,5	18,1 ± 0,43	18,9 ± 0,39	+ 0,8 ± 0,19	0,09	Foie
D valine (5)	20	13,1 ± 0,40	14,1 ± 0,33	+ 1,1 ± 0,18	0,07	Rein
D nor-valine (3)	20	14,0 ± 0,59	14,9 ± 0,38	+ 0,9 ± 0,22	0,10	Rein
D leucine (3)	20	17,2 ± 0,39	18,0 ± 0,24	+ 0,8 ± 0,14	0,05	Rein
D méthionine (3)	20	13,2 ± 0,52	14,7 ± 0,31	+ 1,5 ± 0,35	0,09	Rein
D tryptophane** (2)	15	8,05 ± 0,55	8,6 ± 0,50	+ 0,55 ± 0,05	0,05	Rein
D lysine (1)	20	19,9	-	-	-	Rein

* P : probabilité pour que la quantité d'aminoacide inversé soit statistiquement 0. P ≠ 0,01 est très significatif.

** La deuxième phase, pour les expériences avec le tryptophane, a été faite sous azote.

- Tableau VI -

Pourcentage d'oxydation de divers D aminoacides par un homogénat de rein, 40 minutes, 37°C, air.

D phénylalanine	47,5
D tryptophane	46
D valine	34,5
D méthionine	34
D nor-valine	30
D leucine	14
D lysine	5

Si l'on revient au tableau V, on peut remarquer que les quantités inversées varient d'un acide aminé à l'autre. Mais comme nous venons de voir la variabilité de l'oxydation selon la nature de l'acide aminé, nous avons cherché un inv riant pour comparer les rendements d'inversion. C'est pourquoi nous avons introduit le pourcentage de transamination T = (c-b) x 100 / (a-b) égal au quotient $\frac{\text{aminoacide formé lors de la deuxième phase x 100}}{\text{D aminoacide disparu lors de la première phase}}$.

Si l'on néglige les pertes d'acide cétonique pendant la première phase, ce rapport peut encore s'écrire :

$$T = \frac{\text{L aminoacide formé}}{\text{acide } \alpha\text{-cétonique disponible}} \times 100$$

Ce rapport est constant pour un acide aminé donné ; nous l'avons vérifié pour la phénylalanine, qui s'oxyde bien. On trouve T = 18 $\pm$ 2,1 % (11 expériences).

Le rapport trouvé est moins significatif pour les autres aminoacides essayés. C'est ainsi que l'on a : T = 16 $\pm$ 3,6 % pour la valine (5 expériences) et T = 22 $\pm$ 6,8 % pour la méthionine (3 expériences). Pour le tryptophane enfin, T = 8 $\pm$ 1,4 %.

Aussi, dans un homogénat de rein, la quantité d'aminoacide inversé semble être proportionnelle à la quantité d'acide cétonique

.../

produit. Le rendement atteint un chiffre de l'ordre de 17 % de l'acide cétonique présent, quel que soit l'aminoacide utilisé, sauf pour le tryptophane (figure 3).

2°) Inversion par des homogénats de foie.

Nous nous sommes limités à l'étude de la phénylalanine. En effet, le foie a une activité D aminoacide oxydasique plus réduite que le rein. L'oxydation de la D phénylalanine n'est que de 17,8% en 40 minutes à 37°C, à l'air, contre 47,5 % avec un homogénat de rein.

Le pourcentage de transréamination, calculé sur 4 expériences, en présence de 1 mM de benzoate et de 20 mM de glutamate, est du même ordre de grandeur qu'avec le rein : 18 % (cf. figure 3).

*

* *

Des faits que nous avons exposés dans ce chapitre, nous pouvons dégager les conclusions suivantes :

a) Dans nos conditions expérimentales, les formes D de la phénylalanine, de la valine, de la nor-valine, de la leucine, de la méthionine et du tryptophane, sont inversées par des homogénats de rein de rat. Des homogénats de foie peuvent aussi inverser la D phénylalanine.

b) Le mécanisme de l'inversion in vitro des D aminoacides répond au schéma proposé par CELANDER et BERG (38) : désamination oxydative du dérivé D suivie d'une transréamination en forme L, réaction dans laquelle intervient préférentiellement le L glutamate.

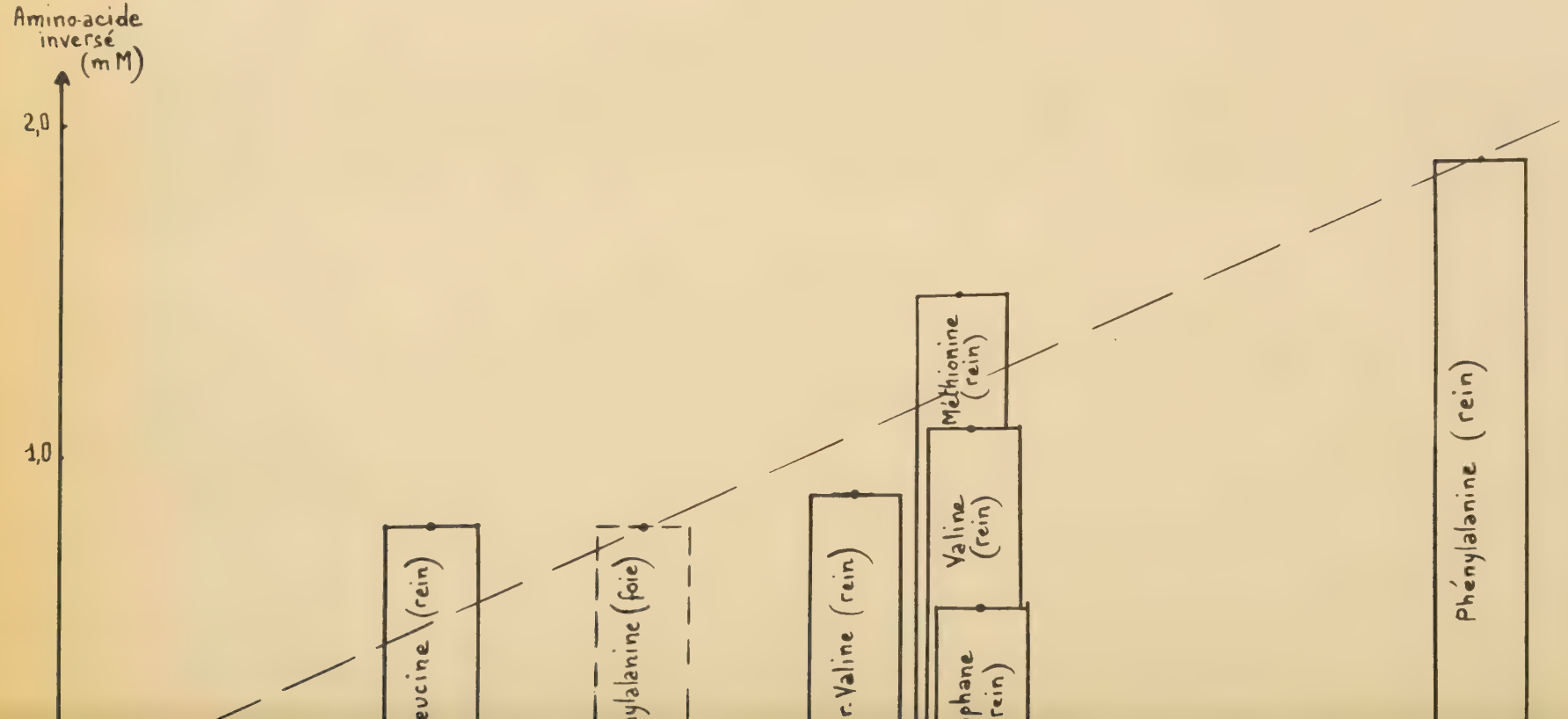
c) Le taux de transréamination étant une donnée pratiquement constante, la quantité d'aminoacide inversé dépend de la concentration en acide cétonique produit, de sorte qu'un D aminoacide qui s'oxyde bien s'inverse bien.

.../

Fig. 3 - Inversion de quelques D aminoacides.

En ordonnées : L aminoacide formé par transréamination.

En abscisses : D aminoacide oxydé.



Mais certaines conditions, que nous allons établir dans les chapitres suivants, permettent de modifier et la concentration d'acide cétonique produit et le taux de transamination. Nous verrons qu'alors le taux de transréamination peut être doublé ou au contraire s'annuler.

*

* *

CHAPITRE III

REGULATION de l'OXYDATION des D AMINOACIDES par les NUCLEOTIDES ADENYLIQUES.

-oooo-

Nous avons rappelé, dans la première partie, les résultats de divers auteurs montrant une augmentation ou une diminution de l'activité de nombreux enzymes dont la D aminoacide oxydase dans les tissus d'animaux placés dans un état nutritionnel ou hormonal donné. L'analyse de tels résultats est certes très complexe, mais on ne peut s'empêcher de les rapprocher du fait que, dans des conditions analogues, les taux relatifs des divers constituants cellulaires sont modifiés, en particulier ceux des nucléotides adényliques.

C'est dans cette perspective que nous avons recherché les effets de l'AMP et de l'ATP sur la désamination oxydative des D aminoacides dans l'homogénat de rein de Rat.

I - EFFET des NUCLEOTIDES ADENYLIQUES sur l'OXYDATION des D AMINOACIDES.

L'oxydation des D aminoacides par un homogénat de rein n'est pas modifiée par adjonction de 10 mM d'AMP. Le Tableau I montre les résultats d'expériences menées avec la D phénylalanine et la D valine.

L'ATP, par contre, inhibe l'oxydation des D aminoacides. Le pourcentage d'inhibition par 10 mM d'ATP est variable selon l'aminoacide considéré : 25,2 % pour la D phénylalanine, 20,3 % pour la D valine, 39 % pour la D nor-valine.

D'autre part, cette inhibition augmente avec la concentration en ATP : 14 % avec 5 mM d'ATP et 25,2 % pour 10 mM d'ATP dans le cas de la D phénylalanine. (Tableau I).

.../

TABLEAU I

Effets de l'AMP et de l'ATP sur l'oxydation des D aminoacides
(Homogénats de rein, 40 minutes à l'air à 37°C)

	Aminoacide oxydé (Nombre d'expériences) (mM $\pm \sigma$ M)		
Addition	D phénylalanine	D valine	D nor-valine
0	10,7 ± 0,20 (15)	6,9 ± 0,33 (9)	5,9 ± 0,30 (6)
AMP 10 mM	10,4 ± 0,36 (7)	7,0 ± 0,44 (7)	- -
ATP 5 mM	9,2 ± 0,07 (5)	- -	- -
ATP 10 mM	8,0 ± 0,27 (16)	5,5 ± 0,22 (13)	3,6 ± 0,12 (5)

* Concentration initiale : 22,5 pour la phénylalanine et 20 mM pour la valine et la nor-valine.

Notons que, dans le cas du foie, pour la D phénylalanine tout au moins, nous n'avons pas observé d'inhibition par l'ATP : 4,2 mM de phénylalanine oxydée en 40 minutes en présence de 10 mM d'ATP contre 4,5 mM pour l'oxydation témoin (moyennes de 4 expériences).

Après avoir établi l'inhibition de la désamination oxydative par l'ATP seul et l'effet nul de l'AMP seul sur cette réaction, la question se pose de savoir si l'ATP en présence d'AMP conserve le même effet.

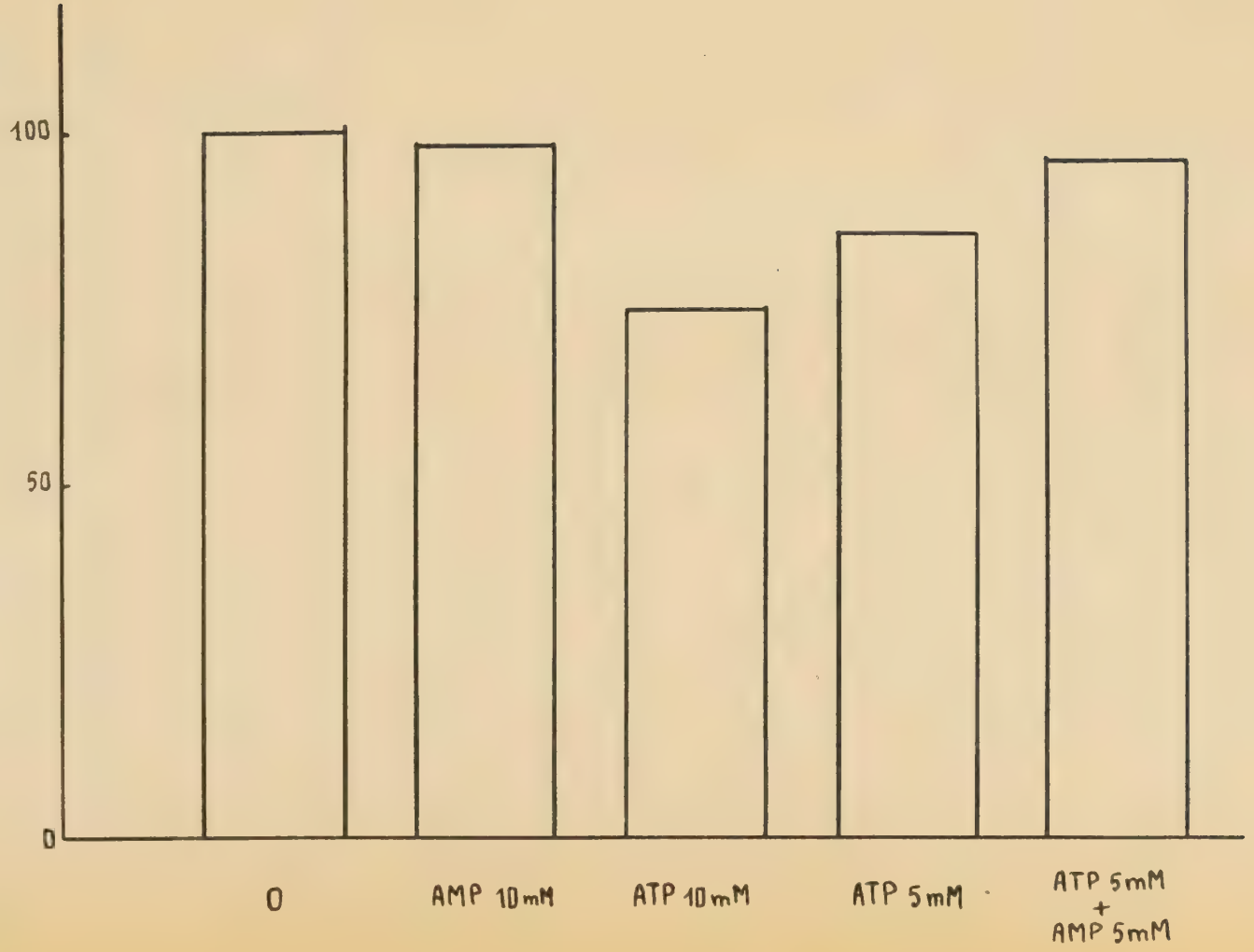
Nos résultats, dans le cas de la D phénylalanine (fig. 1), prouvent qu'il n'en est rien : l'inhibition de 14 % observée avec 5 mM d'ATP seul est pratiquement annulée (4 %) si l'oxydation est faite en présence d'ATP 5 mM et d'AMP 5 mM. Dans cette condition, 10,3 ± 0,31 mM de phénylalanine sont oxydées (6 expériences) au lieu de 10,7 mM pour l'oxydation témoin et 9,2 mM pour l'oxydation en présence d'ATP 5 mM seul.

Ainsi, l'AMP, sans effet lorsqu'il est seul, réduit l'inhibition de l'oxydation des D aminoacides observée avec l'ATP.

.../

Fig. 1 - Effet de l'ATP et de l'AMP sur l'oxydation de la D phénylalanine.

(L'oxydation témoin, sans addition, est prise pour 100).



II - DESTIN de l'ATP pendant la DESAMINATION OXYDATIVE.

L'ATP, dans un homogénat, peut être très rapidement déphosphorylé ; il paraît indispensable de considérer cette éventualité avant de chercher une explication à l'inhibition que nous avons décrite.

Nous envisagerons donc le destin de l'ATP dans nos conditions expérimentales en l'absence, puis en présence d'un D aminoacide.

1) Equilibre Pm - ATP dans un homogénat de rein.

Lorsque dans un homogénat on ajoute de l'ATP en dehors de toute autre addition, on assiste à une déphosphorylation rapide atteignant, en 50 minutes, 90 % de l'ATP introduit (courbe 1 de la fig. 2). Si, par contre, avec l'ATP, on ajoute du phosphore minéral (Pm) en quantité égale à celle du P labile apporté par l'ATP, l'équilibre entre le Pm et le P labile se maintient pendant au moins 40 minutes à 37°C (fig. 2, courbe 2) ; ensuite, une activité ATP asique se développe, probablement à la suite de phénomènes de "vieillissement".

Notons que, si le Pm introduit dans l'homogénat est supérieur au P labile de l'ATP ajouté, une phosphorylation (en présence d'AMP) a lieu, l'énergie nécessaire provenant selon toute vraisemblance de l'oxydation des substrats "endogènes" ; ainsi pour les conditions initiales suivantes : Pm = 22 mM, P labile = 13,4 mM, AMP = 2,4 mM, nous avons observé, en 20 minutes, une diminution du Pm de 1,8 mM.

Par conséquent, en l'absence d'aminoacide ou d'autres substrats ajoutés, lorsque le Pm et le P labile sont introduits en quantité égale dans un homogénat, l'équilibre entre ces deux formes se maintient. Dans le cas contraire, des mouvements du P ont lieu, qui tendent à rétablir l'équilibre.

2) Rupture de l'équilibre Pm - ATP lors de l'oxydation des D aminoacides.

Le fait d'introduire un D aminoacide dans un homogénat de rein en présence d'ATP 10 mM et de Pm 20 mM, provoque une déphosphorylation importante de l'ATP. La courbe 3 de la figure 2 montre ce phénomène pour le cas de la D phénylalanine (22,5 mM). Un phénomène tout

.../

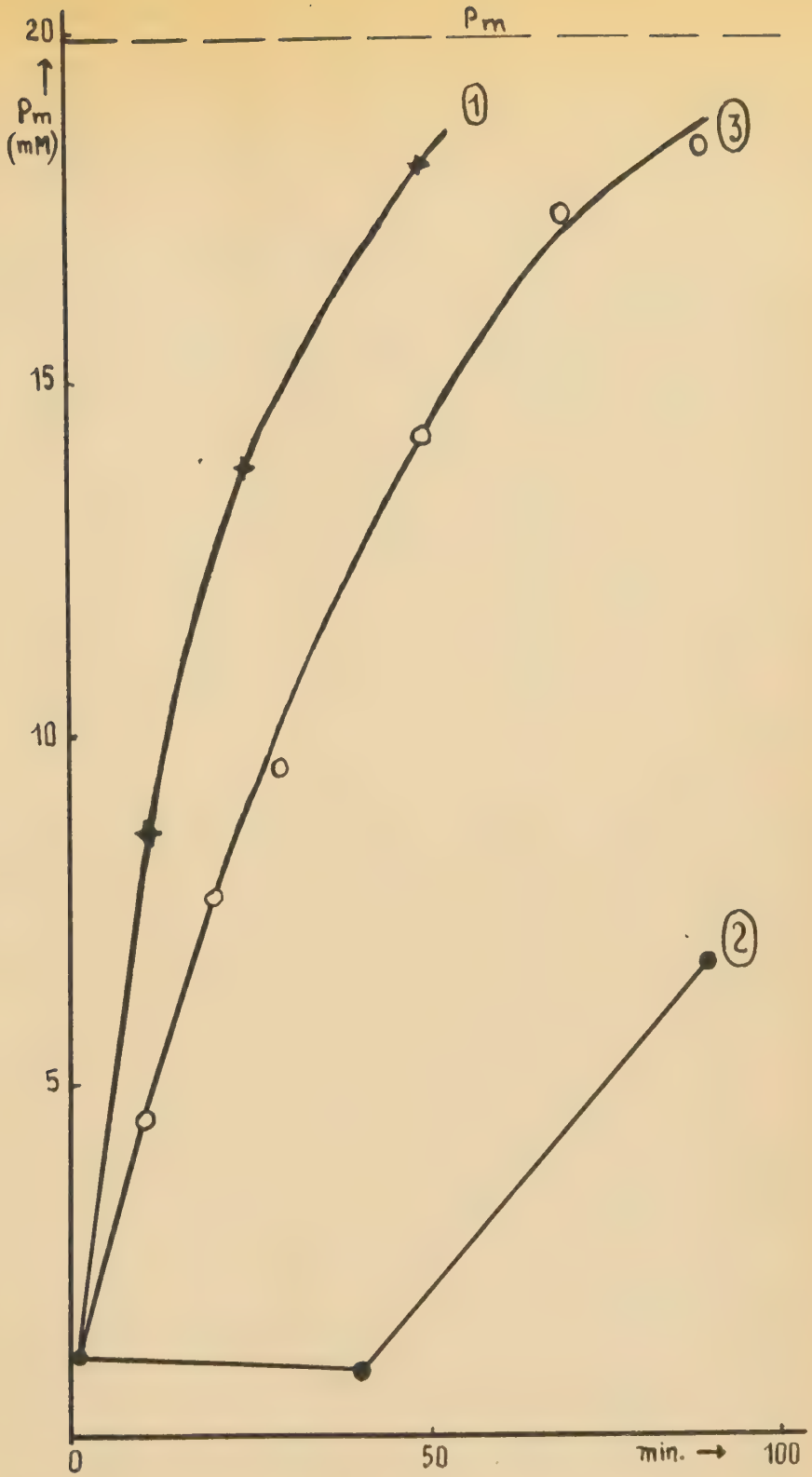


Fig. 2 - Evolution de l'ATP lors de l'oxydation de la D phénylalanine.

Conditions initiales : (1) ATP 10 mM
(2) ATP 10 mM + Pm 20 mM
(3) ATP 10 mM + Pm 20 mM + D phénylalanine 22,5 mM

à fait semblable a été observé dans le cas de la D valine (Tab. II).

TABLEAU II

Rupture de l'équilibre Pm - ATP lors de l'oxydation de la D valine (20 mM) par des homogénats de rein (40 minutes à l'air, 37°C). Conditions initiales : Pm 20 mM ; ATP 10 mM (5 expériences)

Aminoacide introduit	Pm apparu
0	- 0,3
D valine	+ 8,3

D'autre part, la L valine provoque, elle aussi, une déphosphorylation de l'ATP, comme le montre l'expérience suivante : à un homogénat on ajoute, en présence d'ATP (10 mM) et de Pm (20 mM), soit de la L valine (20 mM), soit de la D valine (20 mM). Pour une oxydation, en 40 minutes, de 0,7 mM de l'isomère L, on observe une apparition de 1,1 mM de Pm. Pendant le même temps, 5,8 mM de D valine sont oxydées et 8,8 mM de Pm apparaissent.

La déphosphorylation n'est donc pas le fait des seuls D aminoacides et semble proportionnelle à l'oxydation : dans l'expérience ci-dessus par molécule d'aminoacide oxydée, apparaît 1,57 et 1,52 mM de Pm après oxydation de la L ou de la D valine. La figure 3 montre que la relation entre le Pm apparu et la D phénylalanine oxydée est linéaire. La question se pose donc de savoir si un des produits de la désamination oxydative ne peut provoquer les mêmes effets.

Le Tableau III montre que le phénylpyruvate provoque la même déphosphorylation que la D phénylalanine.

(Tableau III)

.../

Fig. 3 - Relation entre la déphosphorylation de l'ATP et l'oxydation de la D phénylalanine.
Homogénat de rein.

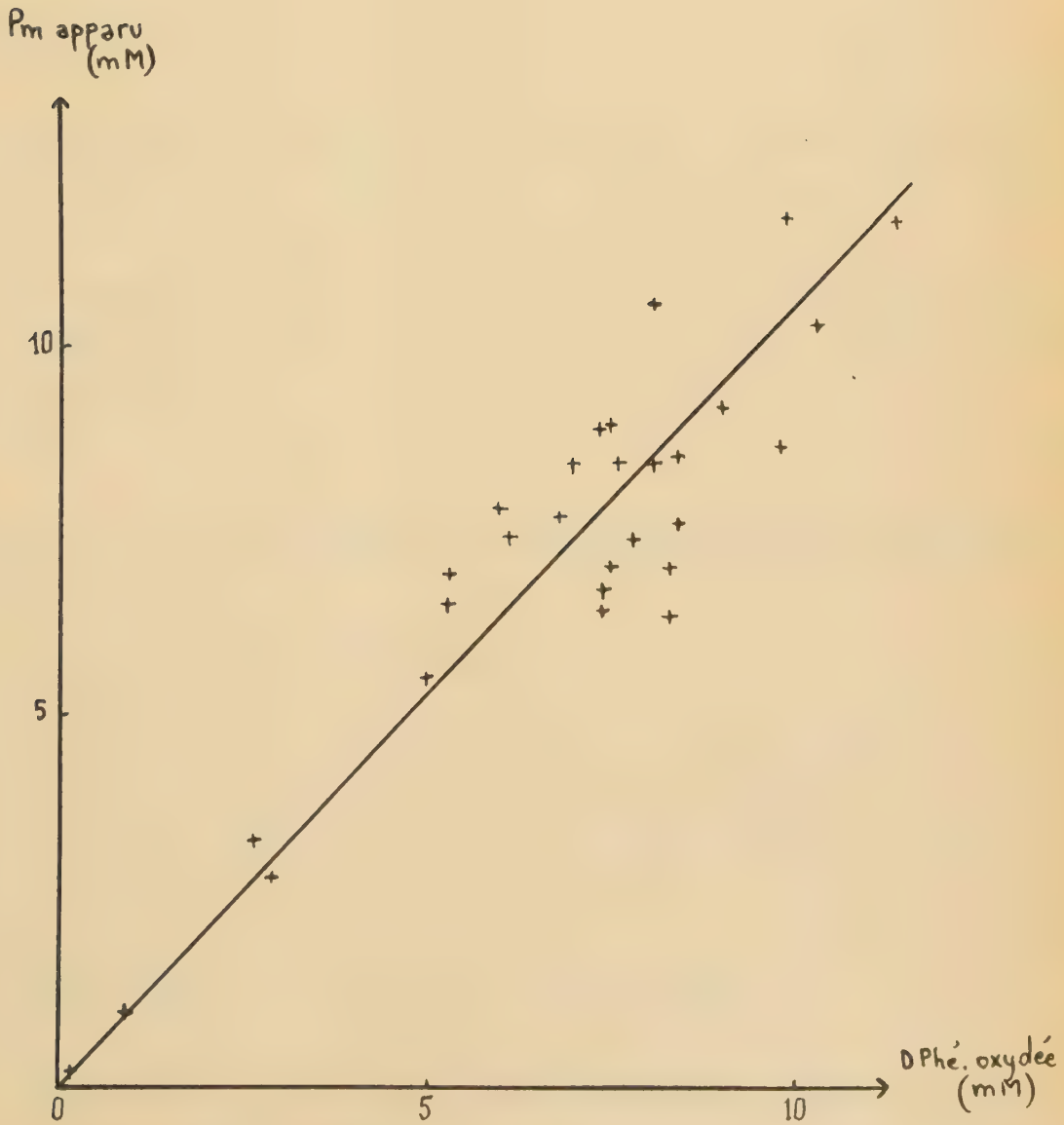


TABLEAU III

Déphosphorylation de l'ATP (10 mM) en présence de D phénylalanine (10 mM) ou de phénylpyruvate (10 mM) Homogénat de rein (30 minutes à 37°C à l'air).

Addition	Pm apparu
0	+ 0,6
D phénylalanine	+ 7,5
Phénylpyruvate	+ 7,8

Il devient clair alors que la déphosphorylation observée pendant l'oxydation des D aminoacides est provoquée par le seul acide cétonique produit au cours de la réaction.

Cela posé, une comparaison s'impose entre l'importance de la déphosphorylation dans diverses conditions et celle de la désamination oxydative.

III - RELATION entre DESAMINATION OXYDATIVE et DEPHOSPHORYLATION de l'ATP.

1) Cas de la D phénylalanine -

La déphosphorylation de l'ATP (10 mM), nous l'avons vu, est proportionnelle à la quantité de phénylalanine oxydée, ou plus précisément à la quantité de phénylpyruvate produit. Pour les 29 expériences portées sur la figure 3, la moyenne des rapports individuels.

$$\frac{\text{Pm apparu}}{\text{phénylalanine oxydée}}$$ est de $1,06 \pm 0,029$.

.../

Pour des concentrations initiales d'ATP plus faibles (Tableau IV), les rapports sont diminués d'une manière statistiquement très significative ($P < 0,01$).

TABLEAU IV

Correspondance entre déphosphorylation de l'ATP et oxydation de la D phénylalanine. Homogénats de rein (40 min. à l'air en présence de 20 mM de phosphate minéral).

Nucléotides ajoutés (Nbre. d'expériences)	D phénylalanine oxydée	Pm apparu	Moyenne des Rapports $\frac{\text{Pm apparu}}{\text{D phénylalanine oxydée}}$
ATP 10 mM (15)	8,0 ± 0,27	8,6 ± 0,32	1,06
ATP 5 mM (3)	9,2 ± 0,10	5,8 ± 0,52	0,63
ATP 5 mM) (6) AMP 5 mM)	10,3 ± 0,31	4,9 ± 0,45	0,45

Il semble tout à fait logique que la réaction de déphosphorylation soit proportionnelle à la concentration des composés en présence. En effet, nous avons montré que le Pm apparu dépend de la concentration du phénylpyruvate (fig. 3) et de celle de l'ATP (Tableau IV). Mais il est évident, d'après ce qui a été dit plus haut, que, si les conditions initiales de l'équilibre Pm - ATP ne sont pas remplies, les mouvements du Pm que l'on observera seront la résultante de deux phénomènes distincts :

- remise à l'équilibre phosphoré,
- déphosphorylation due à l'acide cétonique.

Ainsi, la déphosphorylation observée pour une quantité donnée d'acide cétonique (α KA), c'est-à-dire le rapport $\frac{\text{Pm apparu}}{\alpha \text{ KA}}$, sera la somme algébrique de la déphosphorylation due à l'acide

.../

cétonique et des déphosphorylations (ou phosphorylations) de remise à l'équilibre phosphoré d'après la considération des seules conditions initiales. Le premier terme de cette somme dépend, nous l'avons dit, de la concentration initiale en P labile. Le second peut être représenté par le nombre de déphosphorylations nécessaires à la remise à l'équilibre phosphoré et que nous appellerons Péq.

(Dans les conditions initiales suivantes : P labile 20 mM, Pm 10 mM, on aura Péq = + 5 mM. Pour les conditions initiales : P labile 10 mM, Pm 20 mM, AMP 5 mM (condition du tableau IV, 3ème ligne), on aura Péq = -5 mM).

Nous avons donc porté le rapport $\frac{\text{Pm apparu}}{\alpha \text{ KA}}$ en fonction de la somme algébrique $(\text{P lab.} + \text{P éq.})_o$ pour les 3 conditions initiales du tableau IV, représentées par des cercles sur la figure 4. La relation semble, pour ces conditions, linéaire.

La validité de cette relation a été vérifiée pour le mélange de nucléotides suivant : ATP 5,3 mM + ADP 2,8 mM + AMP 1,0 mM (avec 20 mM de phosphate minéral). Dans ce cas, à une oxydation de 9,2 mM de D phénylalanine, correspond une déphosphorylation de 7,0 mM de Pm (6 expériences). En assimilant l'ADP à un mélange équimoléculaire d'ATP et d'AMP, il vient :

$$(\text{P lab.} + \text{P éq.})_o = 13{,}4 - 2{,}4 = 11{,}0 \text{ mM.}$$

On voit, sur la figure 4, que le rapport de déphosphorylation obtenu dans ce cas particulier, représenté par un triangle, s'inscrit près de la droite précédemment tracée (*) et suit donc la même loi, que l'on peut écrire (A et B étant des constantes) :

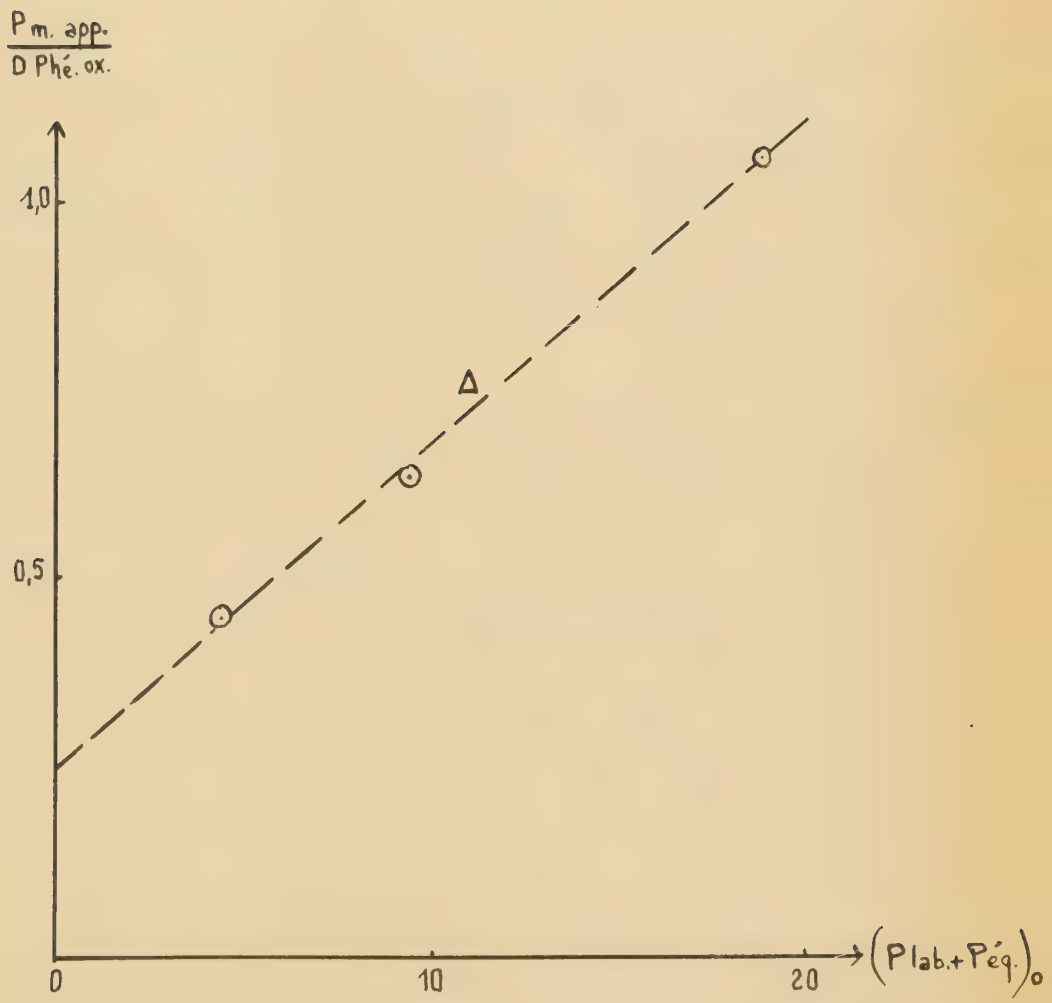
$$\frac{\text{Pm apparu}}{\alpha \text{ KA}} = A + B\,(\text{P lab.} + \text{P éq.})_o$$

(*) Ces expériences justifient le silence que nous avons jusqu'ici observé à propos de l'ADP.

Il ne semble pas en effet, d'après nos résultats, que la forme du P labile intervienne.

.../

Fig. 4 - Relation entre le rapport de déphosphorylation $\frac{\text{Pm apparu}}{\text{D phénylalanine oxydée}}$ et la somme : $P_{labile} + P_{équilibre}$ au temps 0.



Cette relation met en évidence la proportionnalité inverse entre l'acide cétonique formé lors de la désamination oxydative et le P labile initial. Autrement dit, on retrouve ici, par des considérations sur les déphosphorylations, ce que nous avons montré directement tout au début de ce chapitre : l'inhibition par l'ATP de la désamination oxydative et la réduction de cette inhibition par l'AMP.

Cela implique que, si la déphosphorylation n'est due qu'à la présence de l'acide cétonique, elle n'en a pas moins un effet sur la désamination oxydative.

L'éventualité d'un abaissement du pH du milieu réactionnel provenant de l'hydrolyse de l'ATP et provoquant une baisse d'activité de la D aminoacide oxydase, doit être rejetée. L'inhibition est constante tout au long de la réaction, comme le montre le Tableau V. En outre, des mesures du pH en fin de réaction ont donné : pH = 7,21 au bout de 40 minutes : pH = 7,16 au bout de 60 minutes (rappelons que le pH initial est 7,2).

La désamination oxydative, par conséquent, se trouve être réglée par les concentrations relatives d'ATP, d'AMP et de Pm.

TABLEAU V

Inhibition de l'oxydation de la D phénylalanine (22,5 mM) par l'ATP (10 mM). Homogénat de rein, 37°C, air.

Temps d'oxydation (minutes)	Inhibition (%)
10	26,1
15	25,0
25	24,9
30	27,0
40	25,2 (*)

(*) Valeur moyenne du Tableau I.

.../

2) Cas de la valine -

L'analyse ci-dessus n'a pas été entièrement reprise dans le cas de la valine. En 40 minutes et en présence d'ATP 10 mM, on observe une disparition de 5,6 mM de D valine et une apparition de 8,3 mM de Pm (5 expériences). La déphosphorylation, comme nous l'avons vu, semble proportionnelle à la concentration d'acide cétonique produit. Le rapport de déphosphorylation cependant est nettement différent de celui de la D phénylalanine dans les mêmes conditions (1,48 pour les 5 expériences ci-dessus, contre 1,06), la déphosphorylation elle-même étant pratiquement identique (8,3 mM et 8,6 mM).

La différence des rapports de déphosphorylation provient vraisemblablement de l'oxydation différente de la phénylalanine et de la valine et, peut-être aussi, d'une déphosphorylation plus ou moins rapide suivant l'acide cétonique produit.

IV - MECANISME POSSIBLE de l'INHIBITION de la DESAMINATION OXYDATIVE par l'ATP.

La D aminoacide oxydase, d'après BURTON (34a), forme des complexes avec les nucléotides adényliques : ceux-ci entrant en compétition avec la FAD provoqueraient une inhibition de la désamination oxydative. L'AMP, en particulier, a une affinité pour l'association enzyme-D alanine 20 fois supérieure à celle de l'ATP. Or, nous avons vu que l'AMP seul n'exerce, dans nos conditions, aucune inhibition de la D aminoacide oxydase. Des compétitions de ce type ne semblent donc pas, dans notre cas, avoir joué, sous cette forme, tout au moins.

D'autre part, l'interdépendance des deux réactions que nous avons observées : déphosphorylation de l'ATP et désamination oxydative, suggère une double relation de cause à effet :

- la désamination oxydative, en produisant l'acide cétonique, provoque la déphosphorylation;
- l'inhibition de la désamination oxydative est fonction directe de l'importance de la déphosphorylation.

.../

Aussi, devrait-on trouver dans le mécanisme de la déphosphorylation l'explication de l'inhibition de la D aminoacide oxydase.

On connaît un grand nombre de composés susceptibles de provoquer une hydrolyse de l'ATP : ce sont les réactions dites "d'activation" qui s'effectuent globalement de la manière suivante (X représentant un substrat) :

$$ATP + X \longrightarrow ADP + Pm + \text{"X activé"}$$

$$\text{ou } ATP + X \longrightarrow AMP + 2\ Pm + \text{"X activé"}$$

Ces réactions aboutissent en général à un transfert du substrat X sur un composé qui peut être, par exemple, le RNA, dans le cas des aminoacides (64, 23), ou le coenzyme A dans le cas de l'acétate (25). De toute façon, il semble bien, à l'heure actuelle (26, 66, 23), que dans chaque cas, un complexe intermédiaire se forme entre l'ATP, le substrat X et l'enzyme "activant", dont la destruction mènerait au transfert du substrat X et à l'hydrolyse de l'ATP.

Or, IFLAND et coll. (67) ont montré que le phénylpyruvate et non la phénylalanine peut participer à la synthèse de l'enzyme malique (adaptatif chez Lactobacillus arabinosus), lorsque celle-ci est bloquée par un antimétabolite. Ces faits et d'autres du même type (137, 121) indiquent une possibilité d'"activation" des acides cétoniques indépendamment de celle des aminoacides.

L'hypothèse d'une activation des acides cétoniques peut donc être retenue. Elle expliquerait les déphosphorylations observées. La protéïne enzymatique provoquant cette réaction est certes inconnue, mais on peut penser qu'elle devra obligatoirement fixer et l'ATP et l'acide cétonique. Cela est précisément le cas de la D aminoacide oxydase : l'ATP, nous l'avons dit, peut former un complexe avec cet enzyme ; lors du fonctionnement réversible de la D aminoacide oxydase, il semble bien (106, 97) que ce soit l'acide cétonique, plutôt que l'NH_3 ou l'aminoacide, qui se fixe sur la protéine enzymatique.

.../

On peut alors facilement concevoir que la participation de la D aminoacide oxydase à la formation d'un complexe (ATP - acide cétonique - enzyme) sera d'autant plus importante que la concentration en ATP augmentera. Il en résulterait un détournement de l'enzyme au détriment de la désamination oxydative qui se ralentirait.

*

* *

En conclusion, la désamination oxydative, en fournissant un acide cétonique dans le milieu réactionnel, provoque une modification importante du rapport des différentes fractions phosphorées ATP/AMP/Pm. L'hypothèse d'une intervention de la D aminoacide oxydase dans un complexe Enzyme-ATP-acide cétonique rendrait compte, par contre-coup, de la régulation par les nucléotides adényliques de la désamination oxydative des D aminoacides.

-:-:-:-:-:-

CHAPITRE IV

REGULATION de la TRANSREAMINATION par les NUCLEOTIDES ADENYLIQUES

Le chapitre précédent a traité de l'effet des nucléotides adényliques sur la première étape de l'inversion des D aminoacides : la désamination oxydative. L'effet de ces mêmes nucléotides sur la deuxième étape de l'inversion sera étudié dans le présent chapitre.

Nous aborderons celui-ci par l'examen de la transamination (* directe entre le phénylpyruvate et le L glutamate dans des homogénats de rein. Nous examinerons ensuite, en nous replaçant dans le cadre de l'inversion des D aminoacides, la transréamination des acides cétoniques obtenus dans l'homogénat par désamination oxydative des formes D.

A. - TRANSAMINATION DIRECTE PHENYLPYRUVATE - L GLUTAMATE.

1°) Transamination témoin (sans addition).

Sans glutamate, on observe à l'air une transamination "endogène" correspondant à l'apparition de 0,30 mM de phénylalanine en 40 minutes à 37°C. La disparition du phénylpyruvate est plus importante, de sorte qu'il y a une perte de l'ordre de 5 % lorsqu'on considère la somme : acide cétonique restant + aminoacide apparu après 40 minutes (tableau I).

.../

(*) L'expression "transamination directe" signifiera que le phénylpyruvate est introduit directement dans l'homogénat.

Le terme "transréamination" sera réservé pour désigner la deuxième étape de l'inversion ; l'acide cétonique, dans ce cas, sera formé au sein del'homogénat par une désamination oxydative préalable du D aminoacide.

- Tableau I -

Apparition de L phénylalanine et disparition de phénylpyruvate dans des homogénats de rein de rat. Conditions expérimentales : 10 mM phénylpyruvate. Incubation 40 minutes à 37°C, ± 20 mM L glutamate.

Conditions expérimentales	Nb. d'exp	Phénylpyruvate disparu mM ± σ_M	L phénylalanine apparue mM ± σ_M
AIR			
Phénylpyruvate seul	3	0,8 ± 0,12	0,30 ± 0,032
Phénylpyruvate + glutamate	3	1,3 ± 0,41	1,37 ± 0,041
N_2			
Phénylpyruvate + glutamate	2	1,7 ± 0,41	1,66 ± 0,040

En présence d'un excès de glutamate, soit à l'air, soit en anaérobiose, toute la phénylalanine apparue rend compte du phénylpyruvate disparu. Le rendement de transamination :

$$\frac{\text{phénylalanine apparue}}{\text{phénylpyruvate initial}} \times 100,$$ est faible : 13,7 et 16,6 % respectivement. Ces deux valeurs sont statistiquement très différentes ($P < 0,02$).

Ainsi l'anaérobiose favoriserait la réaction de transamination. On peut envisager, en effet, qu'à l'air, le glutamate s'oxyde et que la transamination est moins importante au fur et à mesure que la concentration de glutamate diminue. L'oxydation du glutamate étant sous la dépendance du DPN et du DPNH et par conséquent de l'ATP et de l'AMP, il paraît intéressant, dans l'hypothèse que nous venons de faire, de considérer l'effet de l'ATP et de l'AMP en aérobiose ou en anaérobiose sur la transamination.

.../

2°) Transamination en présence d'AMP ou d'ATP

Le tableau II montre les effets exercés par l'AMP ou l'ATP (10 mM) sur l'apparition de la phénylalaline à partir de 10 mM de phénylpyruvate et de 20 mM de L glutamate, à l'air et sous azote.

A l'air, l'AMP réduit de moitié environ l'apparition de phénylalanine et l'ATP l'accroît légèrement.

Sous l'azote, l'AMP élève un peu la transamination et l'ATP l'augmente très nettement.

- Tableau II -

Effets de l'AMP et de l'ATP sur la transamination phénylpyruvate - L glutamate.
(40 minutes à 37°C, homogénats de rein).

Addition	Phénylalanine apparue (mM $\pm \sigma_M$) (nombre d'expériences)	
	à l'air	sous azote
0	1,37 ± 0,041 (3)	1,66 ± 0,040 (2)
AMP 10 mM	0,63 ± 0,040 (2)	1,93 ± 0,030 (2)
ATP 10 mM	1,61 ± 0,12 (4)	2,31 ± 0,051 (8)

Cet effet de l'ATP ne s'observe pratiquement que sous azote ; la figure 1 montre l'influence de différentes concentrations d'ATP sur la transamination : peu variable à l'air, elle augmente sous azote jusqu'à un plateau obtenu pour 10 mM d'ATP : les rendements de transamination 19,6 % (5 mM d'ATP) ; 23,1 % (10 mM d'ATP) et 22,8 % (20 mM d'ATP), sont tous statistiquement très différents de celui du témoin : 16,6 %.

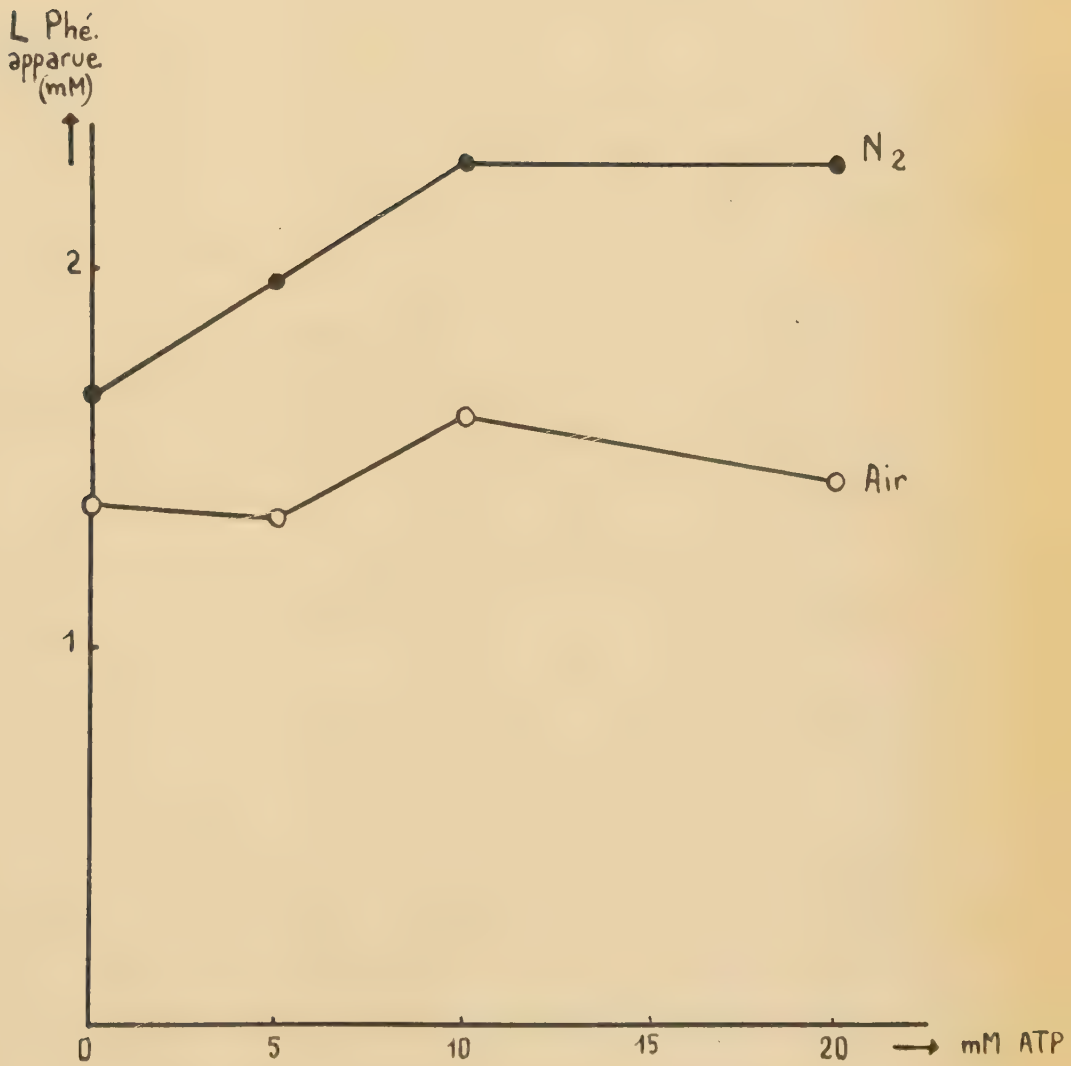
Ces faits s'expliquent aisément par la possibilité du glutamate d'être oxydé. Considérons cette réaction :

glutamate + DPN^+ + H_2O $\rightleftharpoons$ α-cétoglutarate + NH^+_4 + DPNH

La réoxydation du DPNH, possible en anaérobiose, est dépendante de la concentration de l'ATP, qui la contrarie. Une forte con-

.../

Fig. 1 - Effet de l'ATP sur la Transamination phénylpyruvate-L glutamate, à l'air ou sous azote.
Homogénat de rein.



centration en ATP empêcherait donc l'accumulation de DPN et le glutamate resterait disponible pour la transamination. C'est en effet dans ces conditions (anaérobiose, ATP) que la transamination est maximum, les effets de l'anaérobiose et de l'ATP se renforçant.

A l'opposé, c'est évidemment à l'air que l'AMP aura le plus d'effet sur l'oxydation du glutamate en augmentant les phosphorylations oxydatives aux dépens de ce dernier. La transamination est alors minimum, comme nous l'avons vu.

3°) Destin de l'ATP.

Nous avons montré (chapitre III) que le phénylpyruvate seul induisait une déphosphorylation de l'ATP. Nous avons voulu évaluer l'importance de cette déphosphorylation lorsque le glutamate est ajouté au phénylpyruvate.

- Tableau III -

Déphosphorylation de l'ATP au cours de la transamination phénylpyruvate - L glutamate.
(Homogénats de rein, 40 minutes à 37°C, Pm initial = 20 mM)

Concentration initiale en ATP (mM) (Nb. d'expériences)	Pm apparu (mM)	
	sous azote	à l'air
5 (2)	8,5 ± 0,50	- 0,4 ± 0,10
10 (2)	16,2 ± 0,30	- 0,1 ± 0,15
20 (2)	22,4 ± 1,3	+ 3,2 ± 1,1

Sous azote, l'oxydation phosphorylante du glutamate (72) ne pouvant avoir lieu, on observe une forte déphosphorylation de l'ATP. Par contre, à l'air, l'ATP ne s'hydrolyse pas, même s'il est en excès par rapport au Pm, comme dans le cas de l'ATP 20 mM. Il faut donc conclure que le glutamate s'oxyde en suffisamment grande quantité pour contrebalancer la déphosphorylation due à

.../

l'acide cétonique. Cela confirme le rôle pour la transamination de la disponibilité du glutamate.

D'autre part, sous azote, la concentration d'ATP baisse tout au long de la réaction. Aussi l'on peut se demander dans quelle mesure, une modification du rapport ATP/AMP intervient sur la transamination. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des mélanges ATP + AMP à concentration totale constante (10 mM) et nous avons étudié leur effet sur la transamination phénylpyruvate - glutamate à l'air, où la concentration d'ATP varie peu (cf. tableau III), et sous azote.

La figure 2 représente ces transaminations obtenues en fonction du rapport ATP/AMP pour les valeurs suivantes : 10/0 (ATP seul) ; 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 0/10 (AMP seul).

Or, nous voyons qu'à l'air, la diminution progressive de la concentration de l'ATP au profit de celle de l'AMP n'affecte pas la transamination, jusqu'au rapport ATP/AMP = 7/3, où l'effet inhibiteur de l'AMP devient prédominant. Toutefois, la transamination avec 5 mM ATP + 5 mM AMP est de 1,10 $\pm$ 0,13 mM ; elle n'est pas significativement plus basse qu'avec 5 mM d'ATP seul : 1,33 $\pm$ 0,020 mM.

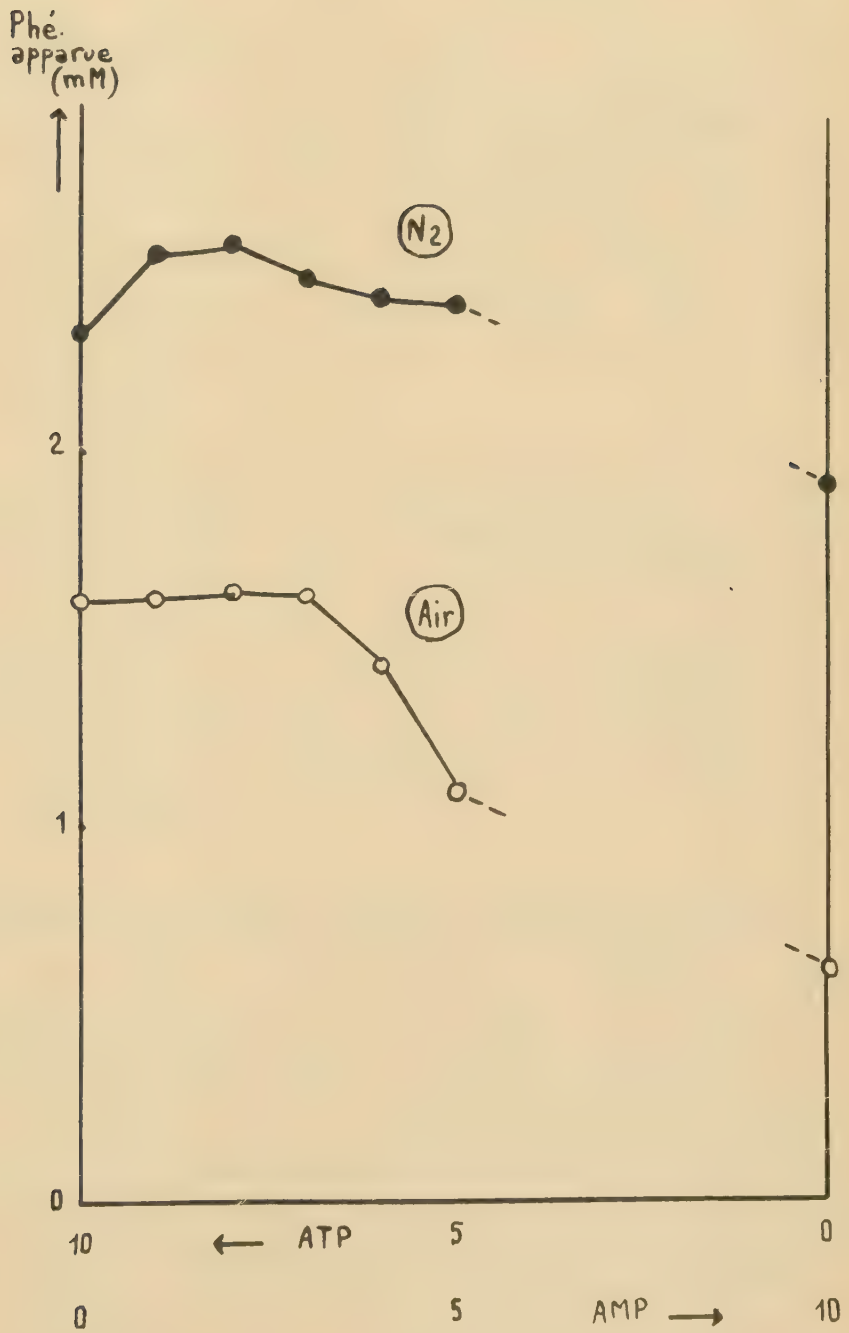
Sous azote, les transaminations quantitativement plus importantes, varient cependant dans des limites beaucoup plus étroites. La transamination maximum observée pour le mélange 8 mM ATP + 2 mM AMP (2,57 $\pm$ 0,16 mM) n'est pas très significativement différente de celle obtenue pour ATP 10 mM ($P = 0,06$).

Il apparaît donc que l'effet de l'anaérobiose prime celui de l'ATP. En effet la variation du rapport ATP/AMP pendant la réaction a peu d'influence sur le rendement de la transamination. A l'air, par contre, il en est tout autrement.

Dans cette perspective, une augmentation de la concentration d'NH_3 à l'air, et en présence d'ATP devrait augmenter la disponibilité du glutamate pour la transréamination. En effet, en présence de $ClNH_4$ (10 mM) et d'ATP (10 mM), la transamination

.../

Fig. 2 - Effet du rapport ATP/AMP, à concentration totale ATP + AMP constante (10 mM), sur la transamination phénylpyruvate-L glutamate, à l'air et sous azote.



phénylpyruvate - glutamate aboutit à une synthèse de 1,87 ± 0,030 mM de phénylalanine (2 expériences) au lieu de 1,66 ± 0,040. Mais cette augmentation est relativement faible.

*

* *

Ainsi une régulation de la transamination phénylpyruvate - glutamate a été mise en évidence dans des homogénats de rein sous l'influence des nucléotides adényliques. En fait, cette régulation s'explique par la disponibilité du glutamate pour la transamination. Dans les conditions où celui-ci s'oxyde bien, la transamination est très réduite ; inversement, elle est maximum lorsque le glutamate ne peut s'oxyder, c'est-à-dire en présence d'ATP, ou en anaérobiose.

Un couplage transamination - déshydrogénation du glutamate doit donc être envisagé par l'intermédiaire duquel la régulation par l'ATP et l'AMP s'opère, comme le suggère BRAUNSTEIN (28).

Nous allons étudier, dans la suite de ce chapitre, comment s'effectue cette régulation dans le cas plus compliqué de la transréamination d'un acide cétonique obtenu après désamination oxydative du D aminoacide correspondant.

B. - DISPONIBILITE du GLUTAMATE pour la TRANSREAMINATION.

Les faits que nous venons de montrer touchant la disponibilité du glutamate impliquent un "bon état" de l'homogénat : les phosphorylations notamment doivent être couplées aux oxydations, sinon ni l'ATP ni l'AMP n'auront leur effet régulateur. Nous avons vu que cette condition est remplie dans le cas des transaminations directes. Il est douteux qu'il en soit de même avec un homogénat qui a préalablement oxydé un D aminoacide.

Une telle préincubation en présence de D aminoacide devrait "vieillir" l'homogénat et le rendre incapable d'effectuer des

.../

contrôles en présence d'AMP et d'ATP puisque la chaîne des transporteurs d'hydrogène ne fonctionnant pas (74, 85, 138, 93), les phosphorylations oxydatives n'ont pas lieu. Des mesures de l'oxydation du glutamate, effectuée à l'appareil de Warburg (tableau IV), montrent en effet l'incapacité de l'AMP à accroître l'oxydation du glutamate lors d'une transréamination (2ème phase de l'inversion) à moins que lors de la phase de désamination oxydative l'homogénat n'ait été stabilisé, par l'AMP ou l'ATP.

De ces résultats, on peut déduire, qu'après la première phase de l'inversion, la transréamination sera découplée de la déshydrogénation du glutamate et que ni l'anaérobiose, ni l'AMP, ni l'ATP n'auront d'effet visible sur la resynthèse de L aminoacide. C'est effectivement ce que nous avons trouvé (tableau V).

- Tableau IV -

Influence de l'état de l'homogénat de rein sur le contrôle de l'oxydation du L glutamate (20 mM) par l'AMP. (Homogénat préincubé en présence de D phénylalanine (22,5 mM) et de phosphate (20 mM) pendant 40 minutes à 37°C. L'oxydation du D aminoacide est ensuite arrêtée par 1 mM de benzoate et le glutamate est alors ajouté).

Addition avant la préincubation	Addition après la préincubation	Oxydation du glutamate (µl O_2 en 30 minutes)
0	0	28
0	AMP 10 mM	19
AMP 10 mM	0	107
ATP* 5 mM	0	144
ATP* 10 mM	0	161
Témoins sans préincubation	0	34
	AMP	173

(*) Rappelons que l'ATP préincubé avec la D phénylalanine s'hydrolyse : après la préincubation on a donc un mélange d'AMP et d'ATP.

.../

- Tableau V -

Transréaminations dans un homogénat vieilli. (Oxydation de la D phénylalanine (22,5 mM) 40 minutes à l'air à 37°C, suivie d'une transréamination de 40 minutes à 37°C, à l'air ou sous azote, en présence de glutamate 20 mM et d'ATP ou d'AMP).

Addition (Phase de transréamination)	Phénylalanine inversée (mM)	
	à l'air	sous azote
0	1,9	1,8
AMP 10 mM	2,2	1,9
ATP 10 mM	1,7	1,6

Ainsi, pour observer un effet des nucléotides adényliques sur la transréamination, deuxième étape de l'inversion des D amino-acides, il est nécessaire de stabiliser l'homogénat dès la première étape.

On sait que les nucléotides adényliques, précisément, jouent ce rôle de stabilisants (88, 104, 122) et nous l'avons vérifié en ce qui concerne le contrôle par l'AMP de l'oxydation du glutamate. Il en est de même des acides du cycle tricarboxylique qui, en assurant une recharge de l'ATP présent dans l'homogénat, conservent l'intégrité des structures et des activités enzymatiques. C'est ainsi que l'on emploie le fumarate (28), par exemple.

Nous étudierons successivement les transréaminations effectuées dans des homogénats stabilisés par les nucléotides adényliques puis par le succinate, l'AMP ou l'ATP pouvant dans ce dernier cas n'être ajoutés qu'au début de la transréamination.

.../

C - TRANSREAMINATION des ACIDES CETONIQUES.

- HOMOGENATS STABILISES par l'AMP ou l'ATP.

L'examen des transaminations directes a montré l'importance de l'anaérobiose et du rapport $\frac{ATP}{AMP}$ pour la synthèse de la phénylalanine, révélant par là un couplage de la transamination et de l'oxydation du glutamate.

L'étude de ce couplage lors de l'inversion des D aminoacides implique une stabilisation de l'homogénat. Nous envisagerons d'abord une stabilisation par les nucléotides adényliques (AMP et ATP).

Rappelons que l'ATP se déphosphorylant lors de la première étape de l'inversion, la transréamination s'effectuera en présence d'un mélange d'ATP et d'AMP. L'effet de fortes concentrations d'ATP ne pourra donc être observé. L'emploi du succinate comme agent de stabilisation permettra, comme nous l'exposerons plus loin, d'obvier à cet inconvénient.

1) Effet de l'AMP (introduit au début de l'inversion) -

L'AMP, ajouté au début de l'expérience, à la concentration finale de 10 mM, inhibe totalement la transréamination du phénylpyruvate produit à partir de la D phénylalanine dans un homogénat de rein de rat, à l'air et en présence de benzoate (*).

Le chiffre trouvé est de 0,0 $\pm$ 0,39 mM (7 expériences). Dans un homogénat non stabilisé (sans AMP), l'inversion témoin est 1,9 $\pm$ 0,19 (11 expériences), soit un rendement de transamination de 18 %. La différence est très significative : $P < 0,01$.

L'effet de l'AMP, à l'air, est donc encore plus net ici que lors des transminations directes.

(*) A moins d'indications contraires, les expériences d'inversion sont effectuées dans les conditions que nous avons définies au chapitre II : oxydation du D aminoacide à l'air (40 min., 37°C) suivie d'une transréamination en présence de L glutamate (20 mM) soit à l'air et en présence de benzoate, soit sous azote (40 min. 37°C). Ces conditions seront dites "normales".

.../

2) Effet de l'ATP (introduit au début de l'inversion) -

Les transréaminations sont en général augmentées lorsque l'ATP a été introduit au début de l'expérience surtout sous azote où elles dépassent 40 % (Tableau VI). (Les quantités de phénylpyruvate disponible au début de la transamination variant avec la concentration initiale d'ATP (cf. chap. III), la comparaison des diverses conditions du Tableau VI devra se faire d'après les rendements de transréamination). Comme dans le cas des transaminations directes, l'évolution du Pm a été suivie pendant la réaction.

- Tableau VI -

Effet de l'ATP sur l'inversion de la D phénylalanine.
Homogénat de rein. Conditions normales.

Addition au temps 0	Transréamination			
	mM $\pm \sigma_M$	%	mM $\pm \sigma_M$	%
0	1,9 $\pm$ 0,19 (11) *	18	1,8 $\pm$ 0,52 (4)	17
ATP 5 mM	1,3 $\pm$ 0,17 (5)	14	3,4 (1)	36,5
ATP 10 mM	2,2 $\pm$ 0,23 (7)	27,5	3,6 $\pm$ 0,20 (9)	45
ATP 5 mM) + AMP 5 mM)	2,0 $\pm$ 0,15 (2)	19	4,5 $\pm$ 0,41 (4)	44

* Nombre d'expériences.

Dans le Tableau VII, nous avons inscrit, pour chaque condition d'inversion avec nucléotides ajoutés au départ, le phosphate minéral apparu pour chaque phase.

A l'air, la déphosphorylation de l'ATP est pratiquement nulle. C'est le glutamate qui, en s'oxydant, permet le maintien de l'équilibre Pm-ATP. En effet, si l'on fait une expérience avec 10 mM ATP au départ, mais sans ajouter de L glutamate au début de la deuxième phase, la déphosphorylation de l'ATP continue : il apparaît 7,5 mM Pm en 40 minutes ; dans ces conditions, nous rappelons qu'il n'apparaît pas de L phénylalanine.

.../

- Tableau VII -

Déphosphorylation de l'ATP au cours de l'inversion de la D phénylalanine.
Homogénat de rein stabilisés par l'ATP ou un mélange ATP + AMP. Conditions normales.

Addition au temps 0	Pm apparu au cours de l'oxydation mM ± σ_M	Pm apparu au cours de la transréamination mM ± σ_M	
		à l'air	sous azote
ATP 5 mM	5,8 ± 0,52 (6) *	0,3 ± 0,64 (5)	3,0 (1)
ATP 10 mM	8,6 ± 0,32 (16)	-0,5 ± 0,84 (7)	7,2 ± 0,54 (9)
ATP 5 mM) + AMP 10 mM)	4,9 ± 0,45 (6)	2,2 ± 0,54 (2)	3,1 ± 0,47 (4)

* Entre parenthèses : nombre d'expériences.

Ainsi, on retrouve, lors de la transamination directe et de la transréamination, des faits analogues : maintien de l'équilibre phosphoré à l'air aux dépens du glutamate et, corollairement, transréaminations très élevées sous azote.

De même, il est possible de retrouver une influence du rapport ATP/AMP établi au début de la transréamination sur la synthèse de la L phénylalanine.

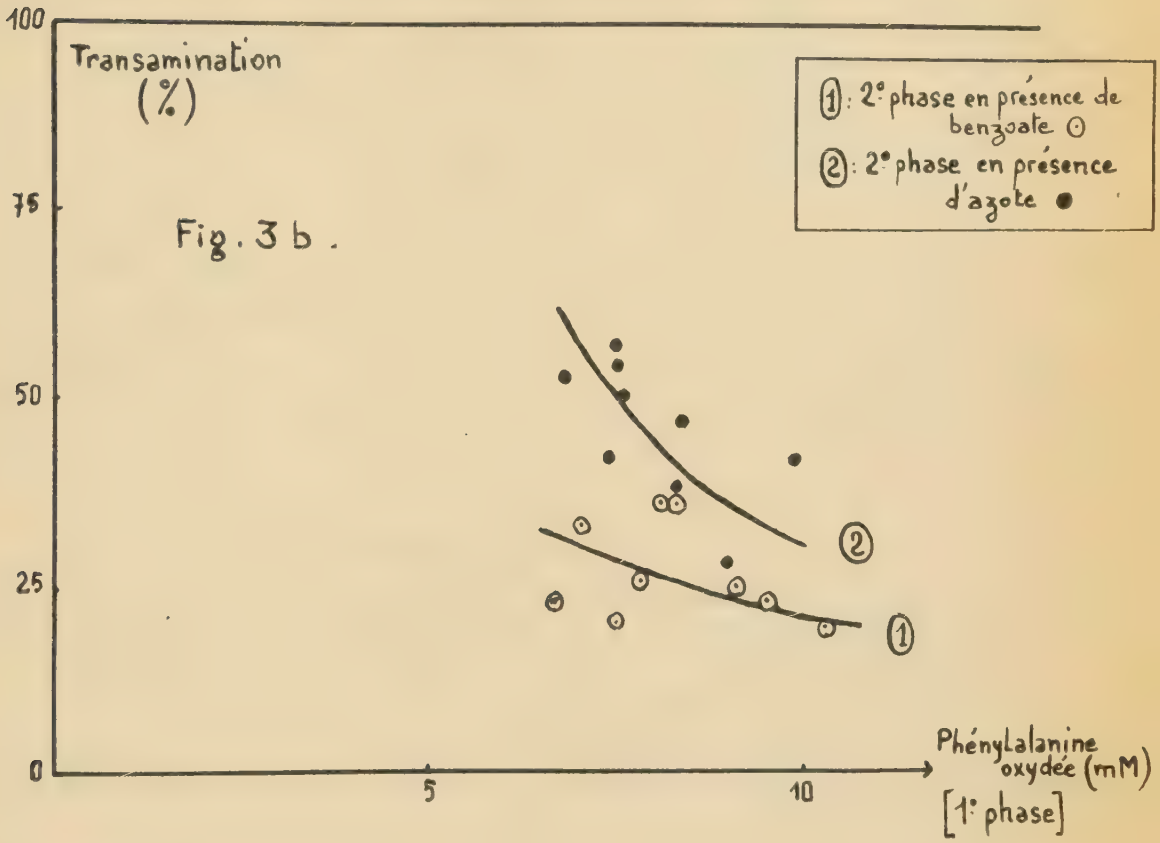
En effet, pour la condition initiale ATP 10 mM, nous avons porté (fig. 3) en fonction de la D phénylalanine oxydée la transréamination du phénylpyruvate obtenue à chaque expérience, exprimée en mM de phénylalanine apparue (fig. 3 a) et en rendement de transamination (fig. 3 b).

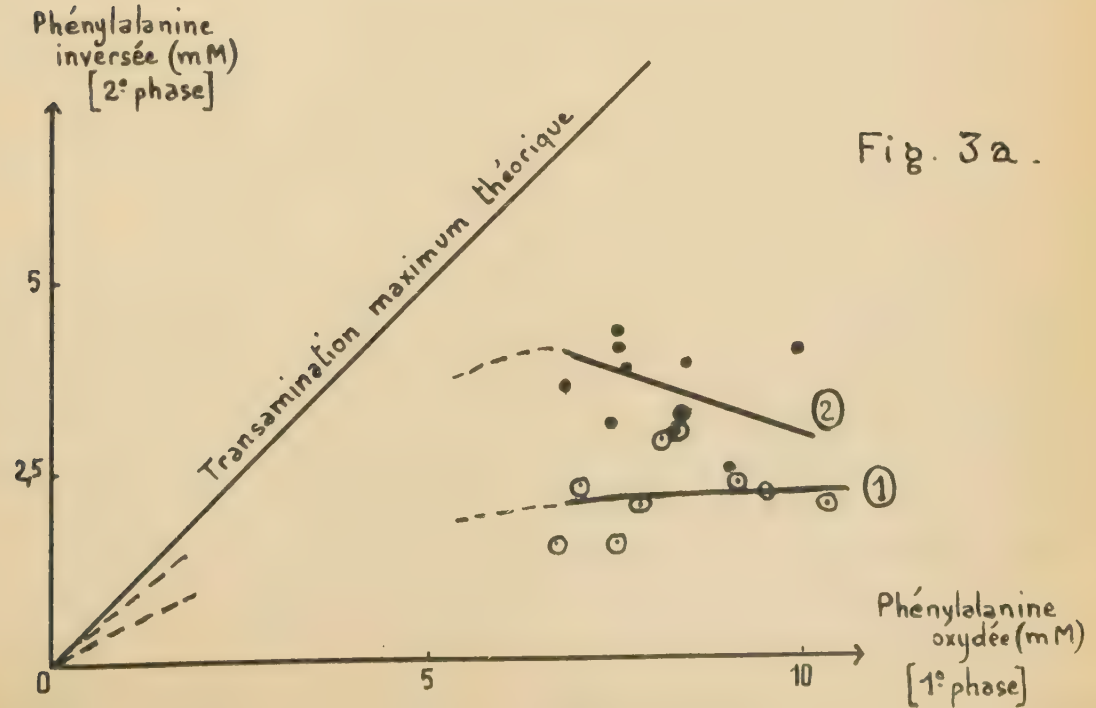
- A l'air (courbes 1), l'inversion a atteint un plateau, elle ne dépend plus de la concentration du phénylpyruvate présent au début de la phase de transréamination.

.../

Fig. 3 - Inversion de la D phénylalanine en présence d'ATP.

L phénylalanine transréaminée (Fig. 3a) et rendement de transamination (fig. 3b) en fonction de l'oxydation de la D phénylalanine pendant la première phase de l'inversion.





- Sous azote (courbes 2), l'inversion diminue nettement avec la quantité de phénylpyruvate obtenue, après avoir passé par un maximum puisque la transréamination est forcément nulle pour l'origine des abscisses.

L'interprétation de ce fait paradoxal est possible si l'on se rappelle que, pour une concentration d'ATP donnée, la déphosphorylation de l'ATP est proportionnelle à la désamination oxydative du D aminoacide : plus on a de phénylpyruvate, et plus le rapport ATP/AMP est abaissé.

On peut donc s'attendre à ce que la transréamination soit d'autant plus élevée que l'oxydation du D aminoacide, en présence d'ATP, a été plus lente, contrairement à ce qui a été établi pour les inversions témoins (sans ATP). C'est en effet ce que montre le Tableau VIII.

- Tableau VIII -

Inversion de quelques D aminoacides.
Homogénats de rein stabilisés avec un mélange de nucléotides (ATP 5,3 mM + ADP 2,8 mM + AMP 1,0 mM). Conditions normales.

Aminoacide (Nbre d'expériences)	mM oxydées	mM transréaminées à l'air	Rendement de transamination
D leucine (3)	2,7 ± 0,15	1,5 ± 0,10	55,5
D méthionine (3)	4,9 ± 0,59	2,0 ± 0,15	41
D valine (4)	5,3 ± 0,37	1,2 ± 0,17	22,5
D phénylalanine (10)	8,4 ± 0,28	1,6 ± 0,29	19

On peut remarquer, en outre, que les valeurs de l'oxydation de la D phénylalanine et de la transréamination dans le foie s'intercalent entre les valeurs obtenues pour la D leucine et la D méthionine dans le rein : 4,2 ± 0,55 mM oxydées et 1,8 ± 0,18 mM transréaminées pour 4 expériences, soit un rendement de transamination de 43 %.

Ainsi, à l'air, il est possible d'obtenir des transréaminations

.../

élevées, à condition que le rapport ATP/AMP soit élevé au début de la transréamination.

3) Comparaison entre transamination directe et transréamination -

L'effet des nucléotides adényliques sur les transréaminations est beaucoup plus marqué que sur les transaminations directes. En effet, l'AMP annule toute transréamination alors qu'il n'inhibe que partiellement (à concentration égale) la transamination directe.

D'autre part, les transréaminations à l'air comme sous azote, augmentent avec le rapport ATP/AMP jusqu'à des rendements deux fois plus élevés que ceux obtenus lors des transaminations directes. De plus, en anaérobiose, l'effet du rapport ATP/AMP est très net, au contraire de ce qui a été vu lors des transaminations directes.

Cependant, avant d'interprêter ces divergences, il est nécessaire de considérer l'effet du rapport ATP/AMP sur des transréaminations effectuées à partir de concentrations en acide cétonique comparables, et pour des concentrations en ATP élevées, ce que permet la stabilisation par le succinate.

*

* *

D - EFFET de l'ATP et de l'AMP sur la TRANSREAMINATION.

- HOMOGENATS STABILISES par le SUCCINATE -

La stabilisation de l'homogénat par l'ATP pendant la désamination oxydative, ne permet d'étudier l'effet du rapport ATP/AMP que dans des limites relativement étroites. La stabilisation par le succinate lève cette difficulté puisque les nucléotides adényliques sont introduits au début de la transréamination ; l'effet de différents rapports ATP/AMP pourra donc être observé directement sur la transréamination.

Mais, auparavant, il nous faut dire quelques mots de l'effet propre du succinate sur les deux étapes de l'inversion.

1) Effet propre du succinate -

Le succinate réduit de 11 % l'oxydation de la D phénylalanine et annule pratiquement la transréamination, comme le montre le Tableau IX. Ces inhibitions sont statistiquement très significatives ($P < 0,01$).

- Tableau IX -

Effet propre du succinate sur l'inversion de la D phénylalanine.

Homogénats de rein. Conditions normales

Stabilisation	Phénylalanine (mM)		Rendement de transamination
	oxydée	inversée	
-	10,7	1,9	17,8
Succinate (10 mM)	9,0	0,3	3,4

L'action inhibitrice sur la première phase de la réaction d'inversion pourrait être interprêtée comme une compétition vis-à-vis des cytochromes ou de l'oxygène entre D aminoacide oxydase et

.../

succinodéshydrogénase. KREBS a recours à un argument de ce type pour rendre compte de l'inhibition de l'oxydation de la D alanine par le lactate (84).

On sait, d'autre part, que les acides dicarboxyliques (non cétoniques) exercent une inhibition compétitive vis-à-vis des transaminases (27, 56, 71). Le succinate et ses produits d'oxydation (fumarate, malate) empêcheraient, dans nos conditions, toute transréamination. Une accélération de l'oxydation du succinate, par l'AMP, devrait par conséquent lever cette inhibition sans affecter beaucoup la disponibilité du glutamate puisque, c'est un fait d'expérience courante, le succinate est un substrat dont l'oxydation très rapide prime celle du glutamate. C'est pourquoi toutes les inversions en présence de succinate ont été faites à l'air.

2) Effet de l'AMP et de l'ATP sur la transréamination -

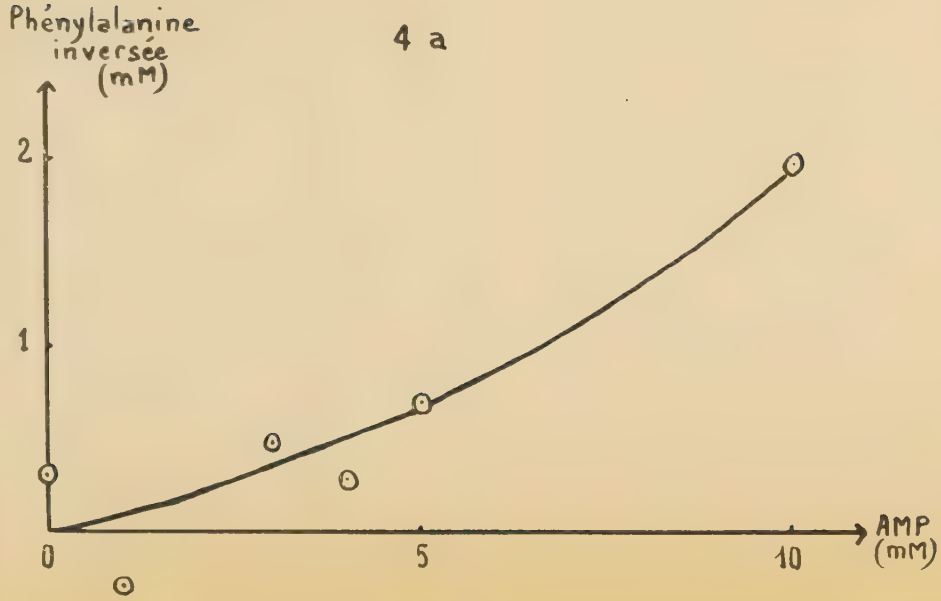
La transréamination dans des homogénats stabilisés par le succinate est progressivement rétablie au fur et à mesure que la concentration d'AMP ajouté augmente (fig. 4 a). Pour 10 mM d'AMP, la transréamination est de 21,7 %.

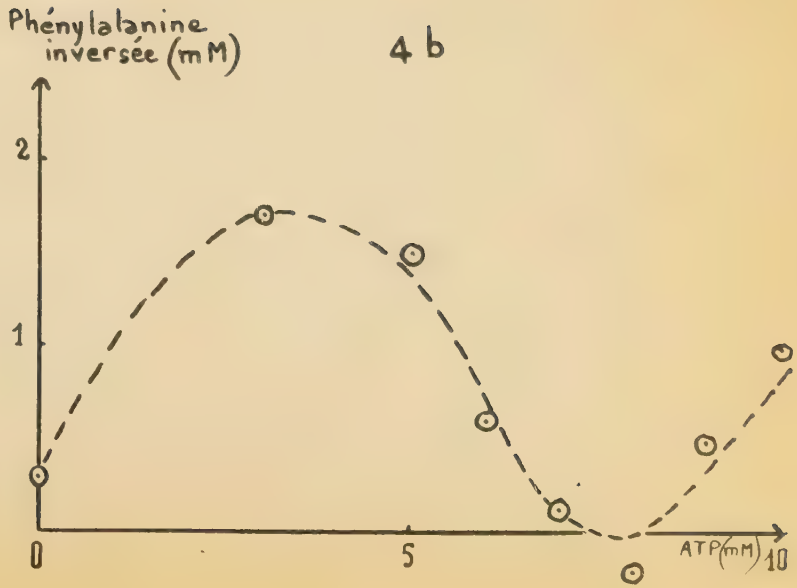
En présence d'ATP (fig. 4 b), les transréaminations suivent au contraire une loi complexe. Si l'on augmente la concentration en ATP, on obtient d'abord une augmentation de la transamination pour 3 à 5 mM d'ATP, puis un retour au zéro (inversion témoin en présence de succinate) pour 7 à 8 mM, suivi d'une nouvelle augmentation pour 10 mM. Les valeurs obtenues pour 3,5 et 10 mM d'ATP sont statistiquement distinctes de zéro. Deux sortes de causalités dans lesquelles intervient l'ATP, paraissent donc pouvoir régler le rétablissement de la transamination en présence de succinate.

En effet, il faut tenir compte, pour interprêter ces variations, du glutamate et du succinate d'une part, et de la déphosphorylation due au phénylpyruvate, d'autre part. Celle-ci, en effet, intervient pour modifier l'oxydation des deux substrats, l'un (le glutamate) favorisant la transréamination, alors que l'autre (le succinate) l'inhibe.

.../

Fig. 4 - Inversion de la D phénylalanine en présence de succinate.
Effet de l'AMP (fig. 4a) et de l'ATP (fig. 4b) sur la phase de transréamination.





Cependant, nous avons montré que les transréaminations varient avec le rapport ATP/AMP établi au début de la phase de transréamination, quelle que soit l'évolution ultérieure de ce rapport ; cela est en effet patent pour les transréaminations que nous avons effectuées sous azote. Aussi nous a-t-il paru intéressant de voir si la stabilisation par le succinate, malgré son caractère particulier, permettait d'observer aussi cette variabilité de la transréamination avec le rapport ATP/AMP. Pour cela, différents mélanges ATP + AMP à concentration totale constante (10 mM) ont été utilisés dans des rapports allant de 10/0 (ATP seul) à 0/10 (AMP seul).

La figure 5 a (courbe A) donne la quantité de phénylalanine inversée en fonction du rapport ATP/AMP, le succinate étant ajouté dès le départ, et les nucléotides au début de la transréamination. L'analyse statistique des résultats montre que les valeurs obtenues pour les rapports 7/3, 4/6 et 3/7 soit 2,5 mM (5 exp.), 2,6 mM (3 exp.) et 2,9 (4 exp.) respectivement, diffèrent très significativement des valeurs témoins obtenues pour 10 mM ATP (rapport 10/0) et 10 mM AMP (rapport 0/10).

La courbe A passe donc par deux maxima, l'un correspondant environ au rapport ATP/AMP = 7/3, et l'autre au rapport ATP/AMP = 3/7. Sur le même graphique, nous avons porté en pointillé (courbe B) la valeur de l'inversion qu'on obtiendrait si, pour chaque mélange ATP + AMP, les influences de chacun des composants étaient additives. Cette courbe représente donc la somme des courbes des figures 4 a et 4 b, en tenant compte du fait qu'ici l'ATP et l'AMP varient en sens inverse.

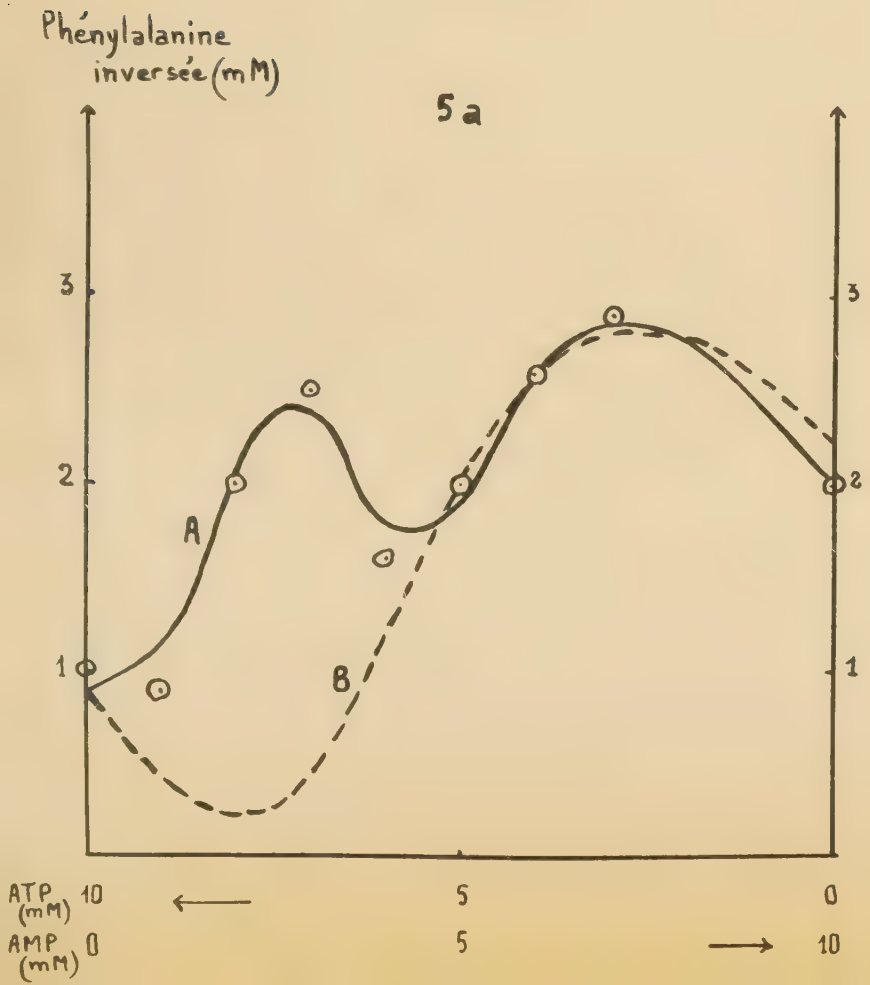
La courbe B est semblable à la courbe expérimentale (courbe A) pour les valeurs du rapport ATP/AMP allant de 5/5 à 0/10. Pour les autres rapports (10/0 à 5/5), il y a une discordance ; nous l'avons mise en évidence dans la figure 5 b, représentant la différence entre les courbes A et B de la figure 5 a. On constate ainsi que :

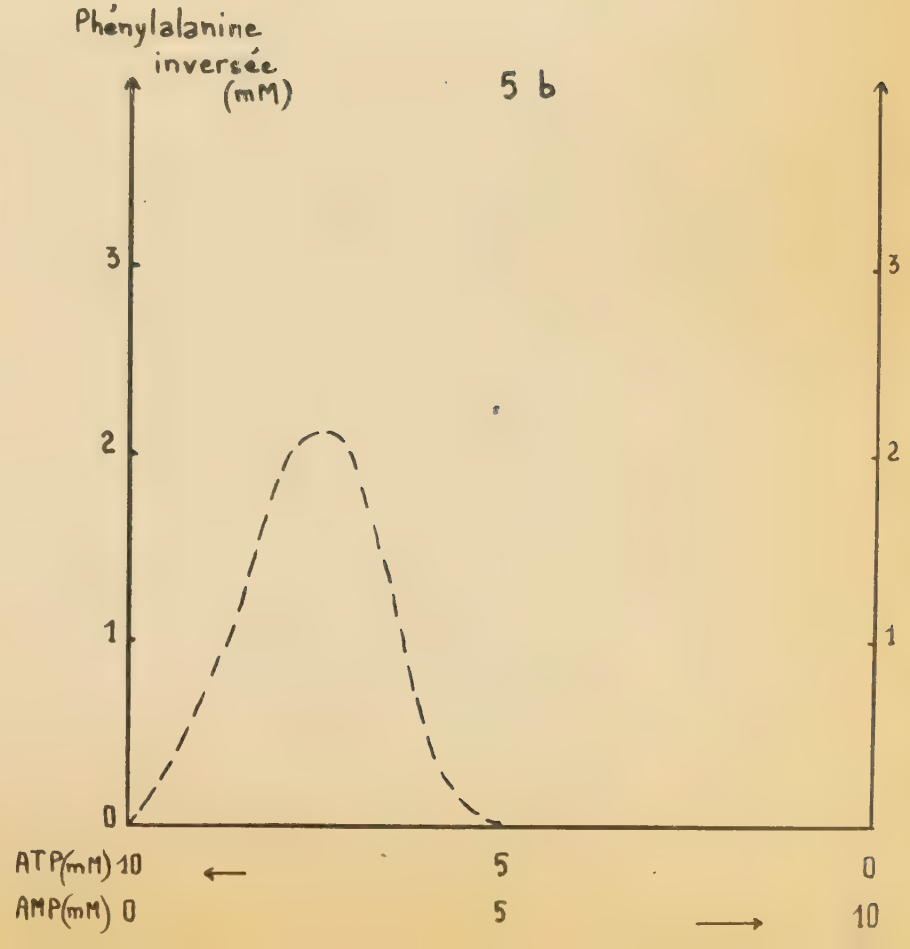
- pour les rapports ATP/AMP allant de 5/5 à 0,10, c'est-à-dire les mélanges pour lesquels l'AMP seul commence à rétablir l'inversion et l'ATP seul a son effet maximum, les deux effets s'ajoutent

.../

Fig. 5 - Inversion de la D phénylalanine en présence de succinate.

Effet du rapport ATP/AMP, à concentration totale ATP + AMP constante (10 mM). Fig. 5a : courbe expérimentale (A) et courbe tracée d'après les courbes de la fig. 4 (B).
Fig. 5b : différence entre les courbes A et B de la fig. 5a.





purement et simplement ; ceci implique deux moyens différents de rétablir la transamination supprimée par le succinate ;

- au contraire, pour les rapports allant de 10/0 à 5/5, zone dans laquelle l'AMP ne rétablit pas la transamination, on observe une inversion supplémentaire, maximum pour un rapport ATP/AMP compris entre 8/2 et 7/3. L'inversion obtenue devrait être respectivement, d'après la courbe B, figure 5 a : 0,2 et 0,5 mM environ. Les valeurs expérimentales correspondantes étant 2,0 et 2,5 mM, l'incrément d'inversion, pour le rapport ATP/AMP = 7,5/2,5, atteint 2 mM.

*

* *

Donc, les transréaminations en présence de succinate sont maximum pour 2 rapport ATP/AMP voisins de 7,5/2,5 et 2,5/7,5 soit 3/1 et 1/3.

Celui-ci semble particulier à la présence de succinate puisque les effets de l'AMP et de l'ATP sont alors additifs et qu'ils ne sont interprétables que si l'on tient compte de la présence du succinate.

Quant au rapport ATP/AMP = 3/1*, il semble en être autrement. C'est en effet pour des rapports voisins que les transaminations directes ainsi que les transréaminations en présence d'ATP, donnent les valeurs les plus élevées et, par conséquent, relativement indépendantes des modalités de la préincubation.

Mais, nous l'avons déjà souligné, les transaminations directes sont toujours beaucoup plus faibles que les transréaminations. Le Tableau X met en évidence ce fait pour le rapport ATP/AMP = 3/1. (Les transréaminations en présence d'ATP sont données pour une oxydation de 7,0 mM de D phénylalanine, ce qui correspond à un rapport ATP/AMP de l'ordre de 6,5/3,5).

Or, les transréaminations diffèrent des transaminations par la présence d'ammoniac et par la préincubation.

---

* Notons que, la réaction de la myokinase fonctionnant dans le rein (43), le rapport ATP/AMP = 3/1 peut s'écrire aussi ATP/AMP : 1/1 comme le montre l'équation :

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2\ ADP$$

.../

- Tableau X -

Effet du rapport ATP/AMP = 3/1 sur la transamination directe et les transréaminations.
Homogénats de rein. Conditions normales.

Phase gazeuse		L phénylalanine synthétisée par		
			Transréamination après stabilisation	
		Transamination directe	par l'ATP (*)	par le succinate
Air	mM	1,7	2,1	2,4
	%	17	30	26,6
N_2	mM	2,57	4,0	-
	%	25,7	57	-

(*) Valeurs obtenues pour un rapport ATP/AMP ≠ 6,5/3,5 Voir le texte.

D'après le couplage de la glutamate déshydrogénase avec les transaminases précédemment mis en évidence, on pourrait s'attendre à ce que la disponibilité du glutamate pour la transamination augmente avec la concentration en NH_3. Nous avons vérifié que cette augmentation avait lieu mais qu'elle était très faible. En effet, l'importance d'une synthèse de glutamate est fonction de la quantité d'∝cétoglutarate fourni. Le Tableau X montre que dans les meilleures conditions 4,0 mM d' ∝-cétoglutarate, au maximum, sont formées ; la concentration en glutamate (intialement de 20 mM) serait donc susceptible d'augmenter, au mieux, de 20 %. Cela semble insuffisant pour expliquer le fait que les transréaminations soient pratiquement doubles, des transaminations directes. Un autre phénomène se superpose donc à la régulation par l'intermédiaire de la glutamate déshydrogénase, qui ne peut alors provenir que de la préincubation pendant laquelle la désamination oxydative s'opère.

.../

Deux séries de faits soulignent cela :

- Dans la seule hypothèse d'un couplage transaminase-glutamate déshydrogénase, plus la concentration en ATP serait élevée, meilleure serait la transréamination, comme c'est le cas pour les transaminations directes. Or, l'inversion en présence de succinate montre que c'est le rapport $\frac{ATP}{AMP}$ qui intervient en plus de la concentration de l'un et de l'autre de ces nucléotides.

- D'autre part, c'est surtout lors de l'anaérobiose que l'effet du rapport ATP/AMP est visible : une oxydation de glutamate est alors hors de question. Ce que nous avons appelé la disponibilité du glutamate est donc maximum.

La variabilité, dans ce cas, de la transréamination avec le rapport ATP/AMP établi au début de la réaction et quelle que soit l'importance des déphosphorylations ultérieures, indique en plus de la régulation indirecte que nous avons évoquée, une véritable préorientation de la réaction de transréamination sous l'influence de ce rapport ATP/AMP initial.

Or, les stabilisations par l'ATP et le succinate ont ceci de commun, qu'elles permettent des phosphorylations, soit par l'ATP ajouté, soit par le renouvellement de l'ATP de l'homogénat au moyen de l'oxydation phosphorylante du succinate. L'hypothèse d'une préactivation des transaminations par phosphorylation peut donc être avancée.

Des phosphorylations d'enzymes menant à des activations des réactions ont été décrites (107,95,61) et pourraient avoir lieu aussi dans le cas des transaminases. Ainsi, une préincubation sans ATP ni substrat oxydable ne permettrait qu'une faible phosphorylation de l'enzyme (cas de l'inversion sans addition) comme d'ailleurs l'absence de préincubation (cas des transaminations directes).

Une préincubation en présence d'AMP pourrait même parvenir à déphosphoryler la "forme active" de l'enzyme présent dans l'homogénat de façon à annuler toute transamination, comme nous l'avons vu.

*

* *

RESUME et CONCLUSIONS GENERALES

Des aminoacides racémiques sont employés en diététique thérapeutique en vue, notamment, de la réalimentation de certains opérés. Or, on sait que l'utilisation par l'organisme d'un mélange de L aminoacides peut augmenter lors d'états de nutrition dits "anaboliques". Il nous a paru intéressant de voir s'il en était de même quand le mélange d'aminoacides comporte des dérivés de la série D.

D'autre part, l'utilisation des D aminoacides à des fins de synthèse protéique implique entre autres étapes une inversion des isomères D en isomères L, et une éventuelle variation de l'utilisation suppose une régulation possible des étapes intermédiaires. Certains états nutritionnels ou certaines hormones ont des effets à la fois sur l'équilibre des composés phosphorés tissulaires, principalement des nucléotides adényliques, et sur l'activité des enzymes assurant l'inversion des D aminoacides (D aminoacide oxydase et transaminases).

Nous avons donc recherché :

- l'influence de l'état nutritionnel sur l'utilisation par le Rat de la D phénylalanine :
- l'influence des nucléotides adényliques sur l'inversion des D aminoacides, c'est-à-dire sur la désamination oxydative et les transaminations, dans des homogénats de tissu.

*

* *

1) En vue d'étudier le premier de ces deux problèmes, trois régimes synthétiques, l'un contenant uniquement des L aminoacides, l'autre étant dépourvu de L phénylalanine et le troisième contenant de la D phénylalanine, ont été donnés à deux groupes de rats normaux

.../

et ayant subi une dénutrition sévère. L'utilisation de ces régimes a été appréciée par les gains de poids des animaux et leurs rétentions azotées.

Nous avons pu observer que les rats dénutris utilisent mieux que les normaux chacun des trois régimes en expérience. En particulier, la carence en phénylalanine est beaucoup mieux supportée par les dénutris.

Nous avons vérifié que la D phénylalanine est utilisée comme la L phénylalanine, et montré qu'elle n'empêche pas l'anabolisme propre aux rats dénutris de se manifester. Cela indique une utilisation accrue de la D phénylalanine dans l'état de nutrition que nous avons provoqué.

2) Avant de rechercher une régulation de l'inversion des D aminoacides sous l'influence des nucléotides adényliques dans des homogénats de tissu, il était nécessaire d'étudier cette inversion elle-même et de montrer qu'il en résultait une synthèse de L aminoacide.

Nous avons donc montré que :

- l'oxydation à l'air d'un D aminoacide dans des homogénats de rein de rat mène à la formation de l'acide cétonique correspondant ;

- cet acide cétonique peut être réaminé par transamination (transréamination) avec un donneur de groupe NH_2, pour aboutir à la formation du dérivé L comme l'indique une analyse des isomères optiques au moyen d'une préparation de D aminoacide oxydase de rein de mouton. L'acide L glutamique est le donneur de groupe NH_2 le plus efficace pour la transréamination, comme l'a d'ailleurs montré BRAUNSTEIN ;

- l'inversion de la D phénylalanine dans le foie et le rein, des isomères D de la valine, nor-valine, leucine, méthionine et du tryptophane dans le rein apparaît proportionnelle à la quantité de D aminoacide oxydé.

La suite des deux réactions : désamination oxydative et

.../

transamination, aboutit donc à une inversion des D aminoacides, selon le schéma classique

D aminoacide --> acide cétonique --> L aminoacide

3) L'ATP inhibe l'oxydation des D aminoacides. Nous avons analysé cette inhibition dans le cas de la D phénylalanine.

Cette inhibition est proportionnelle à la quantité de P labile apporté par l'ATP. L'AMP, sans action quand il est ajouté seul, réduit l'inhibition due à l'ATP.

D'autre part, dans des homogénats de rein, l'ATP subit, pendant la désamination oxydative, une déphosphorylation proportionnelle à la quantité de D phénylalanine oxydée d'une part, et aux concentrations relatives de P minéral et de P labile au temps 0, d'autre part. En outre, l'ADP semble se comporter comme l'ATP, à concentration de P labile égale en ce qui concerne la déphosphorylation comme l'inhibition de la désamination oxydative.

Enfin, nous avons pu montrer que la déphosphorylation était le fait de l'acide cétonique produit pendant la réaction.

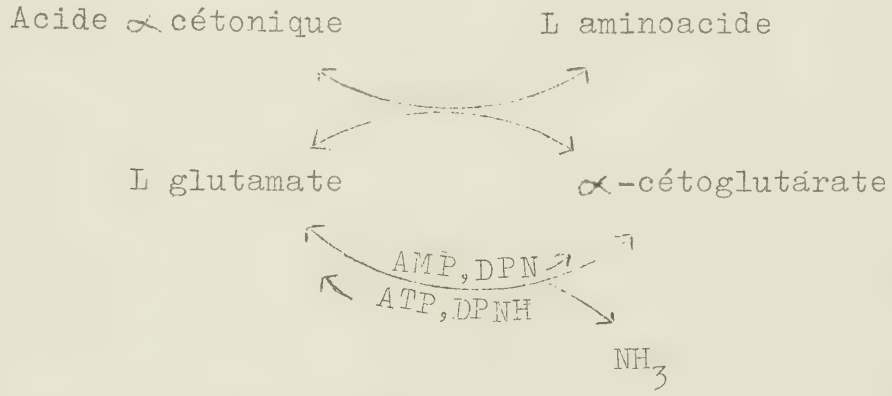
Il existe donc une stricte interdépendance entre la désamination oxydative et le rapport Pm/ATP, l'un réglant l'autre. La mise en évidence de cette régulation par l'intermédiaire de la réaction de déphosphorylation de l'ATP provoquée par l'acide cétonique nous a permis d'envisager une sorte d' "activation" de l'acide cétonique à laquelle pourrait participer la D aminoacide oxydase. Une telle hypothèse expliquerait à la fois la déphosphorylation de l'ATP et l'inhibition de la désamination oxydative.

4) La transamination phénylpyruvate-L glutamate, dans des homogénats de rein dépend des concentrations d'AMP, d'ATP et des conditions d'anaérobiose. A l'air, en présence d'AMP, la transamination est réduite d'environ 50 %. Elle est, par contre, augmentée d'autant

.../

lorsqu'elle est faite en présence d'ATP, sous azote. La présence d'ammoniac l'accroît aussi, mais faiblement.

Ce réglage de la transamination ne peut s'observer que dans des homogénats stabilisés, c'est-à-dire susceptibles d'effectuer des phosphorylations oxydatives et où l'effet accélérateur de l'AMP sur l'oxydation du glutamate est conservé. Il révèle, par conséquent, un couplage de la transamination avec la réaction de la glutamate déshydrogénase, couplage que l'on peut schématiser de la manière suivante :



Ce couplage met en lumière le rôle important du glutamate dont la "disponibilité" pour la transamination est fonction des concentrations relatives de l'ATP et de l'AMP, du DPN et DPNH, de l'∝-céto glutarate et de l'ammoniac.

5) Nous avons étudié l'effet des nucléotides adényliques sur la transréamination de l'acide cétonique dans des homogénats ayant au préalable effectué une oxydation du D aminoacide. L'observation d'une régulation des transréaminations par l'ATP et l'AMP requiert, avons-nous dit, une stabilisation de l'homogénat. De l'AMP, de l'ATP ou du succinate, employés dans ce but, ont donc été ajoutés au début de l'expérience.

Dans des homogénats stabilisés par l'AMP, les transréaminations sont nulles. Lorsque la stabilisation est effectuée par l'ATP, la

.../

transréamination ultérieure a lieu en présence d'un mélange de nucléotides, du fait de la déphosphorylation de l'ATP pendant la préincubation (cf. § 3). Nous avons pu montrer qu'alors la synthèse de L aminoacide décroît avec le rapport ATP/AMP, surtout en anaérobiose.

Ce fait est particulièrement net lorsque le "stabilisant" est le succinate : un effet propre du rapport ATP/AMP, indépendant de la somme des effets de l'ATP et de l'AMP, a été mis en évidence. Le maximum de transréamination a lieu pour un rapport ATP/AMP voisin de 3/1.

Il ressort de la comparaison des transaminations directes (sans préincubation préalable) et des transréaminations après désamination oxydative que la préincubation multiplie par deux les effets des nucléotides adényliques. C'est ainsi que l'inhibition par l'AMP passe d'environ 50 % à 100 % ; d'autre part, pour des rapports ATP/AMP analogues, les transréaminations sont près de deux fois plus importantes que les transaminations directes, que la stabilisation soit faite par l'ATP ou le succinate.

Au couplage, transamination - oxydation du glutamate se superpose par conséquent un autre phénomène dû à la préincubation, de telle sorte que l'amplitude de la régulation par les nucléotides adényliques est très accrue. Ces arguments suggèrent une véritable pré-activation des transaminases par l'ATP ajouté ou apporté par l'homogénat et renouvelé par le succinate.

*

* *

Les différents résultats auxquels notre étude nous conduit mettent en évidence le rôle complexe et multiple des nucléotides adényliques dans la régulation de l'inversion des D aminoacides. En effet, la désamination oxydative comme la transamination sont

.../

sous l'étroite dépendance du rapport ATP/AMP, si bien que le rendement de l'inversion, dans certaines conditions, est doublé ou complètement annulé.

En outre, il apparaît que les acides cétoniques occupent dans l'inversion une position-clé, à la fois parce qu'ils sont les intermédiaires obligatoires de la transformation des D en L aminoacides et parce qu'ils agissent directement sur le rapport ATP/AMP qu'ils modifient. Ainsi, le rapport ATP/AMP et l'inversion sont réglés mutuellement l'un par l'autre.

Mais les perspectives qu'ouvre notre travail débordent largement le cadre de l'inversion des D aminoacides.

La réaction des acides cétoniques sur l'ATP, en effet, constitue un argument pour une "activation" des acides cétoniques. De plus, chez les Mammifères, où les D aminoacides sont pratiquement inexistants, le rôle physiologique réel de la D aminoacide oxydase est mystérieux. MEISTER et coll. (97) admettent que le rôle et le substrat normal de cet enzyme sont inconnus. Ainsi, l'hypothèse que nous avons émise d'une participation de la D aminoacide oxydase à l' "activation" des acides cétoniques impliquerait une fonction nouvelle pour cet enzyme.

D'autre part, la transamination avec le glutamate doit être considérée, dans le contexte cellulaire où nous l'avons étudiée, comme soumise à l'influence indirecte de toute une série de "cofacteurs" tels que l'ATP, le DPN, l' α-cétoglutarate, l'ammoniac.

Or, on sait que l'équilibre de ces composés est assuré notamment par le fonctionnement de la chaîne des transporteurs d'hydrogène, du cycle tricarboxylique et de la synthèse de l'urée. Ces transformations métaboliques multiples, qui sont d'ailleurs elles-mêmes soumises à l'influence de l'ATP et de l'AMP, auront par conséquent des répercussions sur les transaminations. Or, celles-ci orientent la distribution de l'azote soit vers la synthèse protéique, soit vers la formation d'urée.

.../

Ainsi, une modification de l'état nutritionnel amènera des variations dans l'utilisation par l'organisme entier des aminoacides qu'ils soient de la série L ou de la série D comme nous l'avons vu.

On comprend alors pourquoi les enzymes des tissus d'animaux, dans certains états nutritionnels ou hormonaux, sont susceptibles de fonctionner d'une manière variable. En fait, leur activité est un reflet de l'activité métabolique générale de la cellule.

-:-:-:-:-:-

B I B L I O G R A P H I E

1. ADLER, E., HELLSTROM, V., GUNTHER, G. et VON EULER, H. -
   Z. Physiol. Chem., 225, 14 (1938)

2. ADRIAN, J. - Communication personnelle.

3. ALBANESE, A.A. -
   J. Biol. Chem., 157, 613 (1945)

4. ALLISON, J.B. -
   Amer. J. Med., 5, 419 (1948)

5. ALLISON, J.B. -
   Federation Proc., 10, 677 (1951)

6. ALLISON, J.B. -
   Supplementation with methionine, in "Some Aspects of Aminoacid Supplementation",
   Rutgers University, 1956, p. 69

7. ARMSTRONG, M.D. -
   J. Biol. Chem., 205, 839 (1953)

8. AWAPARA, J. -
   J. Biol. Chem., 200, 537 (1953)

9. AXELROD, A.E., SOBER, H.A. et ELVEHJEM, C.A. -
   Nature, 144, 670 (1939) ; J. Biol. Chem., 134, 749 (1940)

10. BADDILEY, J. et NEUHAUS, F.C. -
    Biochem. Biophys. Acta, 33, 277 (1959)

11. BADDILEY, J. et NEUHAUS, F.C. -
    Biochim. J., 75, 579 (1960

12. BARTLETT, G.R. -
    J. Amer. Chem. Soc., 70, 1010 (1948)

13. BARTLETT, P.D. et GLYNN, M. -
    J. Biol. Chem., 187, 253-261 (1950)

.../

14. BEATON, G.H., OZAWA, G., BEATON, J.R. et McHENRY, E.W. -
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 83, 781 (1953)

15. BENDER, A.E. et KREBS, H.A. -
Biochem.J., 46, 210 (1950)

16. BEREZOVSKAIJA, N.N. -
Biokhimja, 23, 125 (1958)

17. BERG, C.P. -
J. Biol. Chem., 104, 373 (1934)

18. BERG, C.P. -
J. Nutrition, 12, 671 (1936)

19. BERG, C.P. -
Physiol. Revs, 33, 145 (1953)

20. BERG, C.P. -
Utilization of D aminoacids, in "Protein and Aminoacids Nutrition".
A.A. ALBANESE, Ed., Académic Press, London, p. 57 (1959)

21. BERG, C.P. et POTGIETER, M. -
J. Biol. Chem., 94, 661 (1931)

22. BERG, C.P., ROSE, W.C. et MARVEL, C.S. -
J. Biol. Chem., 85, 219 (1929)

23. BERG, P. -
Ann. Rev. Biochem., 30, 293 (1961)

24. BLOCK, R.J. et BOLLING, D. -
The aminoacid Composition of Proteins and Foods, 576 pp. C.C. THOMAS, Springfield, Illinois, 1951

25. BERG, P. -
J. Biol. Chem., 233, 374 (1958)

26. BOYER, P.D. -
Ann. Rev. Biochem., 29, 15 (1960)

27. BRAUNSTEIN, A.E. -
Advances in Prot. Chem., 3, 1 (1947)

.../

28. BRAUNSTEIN, A.E. -
Advances in Enzymol., 19, 335 (1957)

29. BRAUNSTEIN, A.E., et AZARKH, R.M. -
J. Biol. Chem., 157, 421 (1945)

30. BRAUNSTEIN, A.E. et KRITSMAN, M.G. -
Enzymologia, 2, 129 (1937)

31. BRENNER, M., ZIMMERMANN, J.P., WHERMÜLLER, J., QUITT, P. et PHOTAKI, I. -
Experientia, 11, 397 (1955)

32. BRENNER, M. et ZIMMERMANN, J.P. -
Helv. Chim. Acta, 40, 1933 (1957) ; 41, 467 (1958)

33. BUBL, E.C. et BUTTS, J.S. -
J. Biol. Chem., 180, 839 (1949)

34. BURCH, H.B., LOWRY, O.H., PADILLA, A.M. et COMBS, A.M. -
J. Biol. Chem., 223, 29 (1956)

34a BURTON, K. -
Biochem. J., 48, 458 (1951)

35. CAHILL, W.M. et RUDOLPH, G.G. -
J. Biol. Chem., 145, 201 (1942)

36. CANNON, P.R. -
Some Pathologic Consequences of Protein and Aminoacid Deficiencies, American Lecture Series, C.C. THOMAS, Publish. Springfield, Illinois, 49 pp. (1948)

38. CELANDER, D.R. et BERG, C.P. -
J. Biol. Chem., 202, 339 (1958)

39. CHANTRENNE, H. -
Ann. Rev. Biochem., 27, 35 (1958)

42. CLARK, L.C. Jr., KOCHAKIAN, C.D. et FOX, R.P. -
Science, 98, 89 (1943)

43. COBEY, F.A. et HANDLER, P. -
J. Biol. Chem., 204, 283 (1953)

.../

44. COHEN, P.P. -
The Enzymes, 1, (pt 2) 1040 (1951)

45. CONRAD, R.M. et BERG, C.P. -
J. Biol. Chem., 117, 351 (1937)

46. COX, G.J. et BERG, C.P. -
J. Biol. Chem., 107, 497 (1934)

47. CROSS, R.J., TAGGART, J.V., COVO, G.A., GREEN, D.E. -
J. Biol. Chem., 177, 665 (1949)

48. CUTHBERSON, D.P. -
In "Biochemical Response to Injury", H.B. STONER, Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 193, 1960.

49. DICKENS, F., GLOCK, G.E. et McLEAN, P. -
Ciba Foundation Symposium on Cell Metabolism, p. 150, (1959)

50. EISCHEID, A.M. et KOCHAKIAN, C.D. -
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 85, 339 (1954)

51. EMBDEN, G. et SCHMITZ, E. -
Biochem. Z., 29, 423 (1910) ; 38, 393 (1912)

52. EULER (VON), H., ADLER, E. et STEENHOFF-ERIKSEN, T. -
Z. Physiol. Chem., 248, 227 (1937)

53. EULER (VON), H., ADLER, E., GÜNTHER, G. et DAS, N.B. -
Z. Physiol. Chem., 254, 61 (1938)

54. FRAZIER, L.E., WISSLER, R.W., STEFFEE, C.H., WOOLRIDGE, R.L. et CANNON, P.R. -
J. Nutrition, 33, 65 (1947)

55. FRISELL, W.R., LOWE, H.J. et HELLERMAN, L. -
J. Biol. Chem., 223, 75 (1956)

56. GARCIA-HERNANDEZ, M. et KUN, E. -
Biochim. Biophys. Acta, 24, 78 (1957)

57. GAVOSTO, F., PILERI, A. et BRUSCA, A. -
Biochim. et Biophys. Acta, 24, 250 (1957)

58. McGINTY, D.A., LEWIS, H.B. et MARVEL, C.S. -
J. Biol. chem., 62, 75 (1924-25)

.../

59. GIRI, K.V., RADHAKHRISHNAN, A.N. et VAIDYANA THAN, C.S. -
Anal. Chem., 24, 1677 (1952)

60. GREENSTEIN, J.P., LEVINTOW, L., BAKER, C.G. et WHITE, J. -
J. Biol. Chem., 188, 647 (1951)

61. HAREL, L. et MENDOZA, E. -
Comptes rendus, 250, 4213 (1960)

62. HARROW, B. et SHERWIN, C.P. -
J. Biol. Chem., 60, 683 (1926)

63. HELLERMAN, L., LINDSAY, A. et BOVARNICK, M.R. -
J. Biol. Chem., 163, 553 (1946)

64. HOAGLAND, M.B., STEPHENSON, M.L., SCOTT, J.F., HECHT, L.I. et ZAMECNIK, P.C. -
J. Biol. Chem., 231, 241 (1958)

65. HOLT, L.E., Jr. -
Bull. Soc. Sci. Hyg. aliment., 46, 229 (1958)

66. HOFFMANN-OSTENHOF, O. -
Ann. Rev. Biochem., 29, 73 (1960)

67. IFLAND, P.W., BALL, E., DUNN, F.W. et SHIVE, W. -
J. Biol. Chem., 230, 897 (1958)

68. JACKSON, R.W. -
J. Biol. Chem., 84, 1 (1929)

69. JACKSON, R.W. et BLOCK, R.J. -
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 30, 587 (1933)

70. JACKSON, R.W. et BLOCK, R.J. -
J. Biol. Chem., 122, 425 (1937)

71. JENKINS, W.T., YPHANTIS, D.A. et SIZER, I.W. -
J. Biol. Chem., 234, 51 (1959)

72. KALCKAR, H. -
Biochem. J., 33, 631 (1939)

73. KLEIN, J.R. et HANDLER, P. -
J. Biol. Chem., 139, 103 (1941)

74. KEILIN, D., et HARTREE, E.F. -
Proc. Roy. Soc. London, 119 B, 114, 141 (1936)

.../

75. KLEIN, J.R. -
J. Biol. Chem., 205, 725 (1953)

76. KLEIN, J.R. et KAMIN, H. -
J. Biol. Chem., 138, 507 (1941)

77. KNOOP, F. -
Z. Physiol. Chem., 148, 294 (1925)

78. KNOOP, F. et KERTESS, E. -
Z. Physiol. Chem., 71, 252 (1911)

79. KOCHAKIAN, C.D. et ENDAHL, B.R. -
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 98, 284 (1958)

80. KONDO, K. -
Biochem. Z., 38, 407 (1912)

81. KOTAKE, Y. et GOTO, S. -
Z. Physiol. Chem., 270, 48 (1941)

82. KOVACH, A.G.B. et FONYO, A. -
in "Biochemical Response to Injury", H.B. STONER, Ed.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 129, 1960

83. KREBS, H.A. -
Z. Physiol. Chem., 217, 191 (1933)

84. KREBS, H.A. -
Biochem. J., 29, 1620 (1935)

85. KREBS, H.A. -
The Enzymes, 2, (pt 1), 499 (1951)

86. KREBS, H.A. -
Endeavour, 16, 125 (1957)

87. LARDY, H.A. et FELDOTT, G. -
J. Biol. Chem., 186, 85 (1950)

88. LOOMIS, W.F. et LIPMANN, F. -
J. Biol. Chem., 173, 807 (1948)

89. LUND, C.C. et LEVENSON, S.M. -
in "Proteins and Aminoacids in Nutrition", M. SAHYUN, Ed.,
Reinhold Publishing Co, New-York, p. 349, 1948.

.../

90. MAGASANIK, B. et UMBARGER, H.E. -
J. Amer. Chem. Soc., 72, 2308 (1950)

91. MANDEL, P., BIETH, R. et WEILL, J. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 973 (1953)

92. MEISTER, A. -
J. Biol. Chem., 200, 571 (1953)

93. MEISTER, A. -
in "A Symposium on Aminoacid Metabolism", W.D. McELROY et B. GLASS, Ed.
The Johns Hopkins Press, Baltimore, p. 3, 1955

94. MEISTER, A. et TICE, S.V. -
J. Biol. Chem., 187, 173 (1950)

95. MENDOZA-VILLELA, E. -
Thèse 3ème Cycle, Paris, 1961

96. MITOMA, C., SMITH, T.E., FRIEDBERG, F. et RAYFORD, C.R. -
J. Biol. Chem., 234, 78 (1959)

97. MEISTER, A., WELLNER, D. et SCOTT, S.J. -
J. Nat. Cancer Inst., 24, 31 (1960)

98. MUNRO, N.H. et CHALMERS, M.I. -
Brit. J. Exp. Path., 26, 396 (1945)

99. NEGELEIN, E. et BRÖMEL, H. -
Biochem. Z., 300, 225 (1939)

100. NEUBAUER, O. -
Deutsch. Arch. Klin. Med., 95, 211 (1909)

101. NEUBERGER, A. et SANGER, F. -
Biochem. J., 38, 119 (1944)

102. OCHOA, S. et ROSSITER, R.S. -
Biochem. J., 33, 2008 (1939)

103. OSBORNE, T.B. et MENDEL, L.B. -
J. Biol. Chem., 37, 572 (1919)

104. POTTER, V.R. et RECKNAGEL, R.O. -
Phosphorus Metabolism, 1, 377 (1951)

.../

105. PUTNAM, F.W., MIYAKE, A. et MEYER, F. -
J. Biol. Chem., 231, 657 (1958)

106. RADHAKRISHNAN, A.N. et MEISTER, A. -
J. Biol. Chem., 233, 444 (1958)

107. RALL, T.W., SUTHERLAND, W. et WOSILAIT, W.D. -
J. Biol. Chem., 218, 483 (1956)

108. RATNER, S., SCHOENHEIMER, R. et RITTENBERG, D. -
J. Biol. Chem., 134, 653 (1940)

108a RATNER, S. et PAPPAS, A. -
J. Biol. Chem., 178, 1183-1199 (1949)

109. RECHCIGL, M., LOOSLI, J.K. et WILLIAMS, H.H. -
J. Biol. Chem., 231, 829 (1958)

110. REVEL, S.P. et BALL, E.G. -
J. Biol. Chem., 234, 577 (1959)

111. ROSE, W.C. -
J. Biol. Chem., 94, 155 (1931)

112. ROSE, W.C. -
Science, 86, 298 (1937)

113. ROSE, W.C. -
Physiol. Revs., 18, 109 (1938)

114. ROSE, W.C., JOHNSON, I.E. et HAINES, N.J. -
J. Biol. Chem., 145, 684 (1942)

115. ROSE, W.C. et WOMACK, M. -
J. Biol. Chem., 166, 103 (1946)

115a ROSEN, F., ROBERTS, N.R. et NICHOL, C.A. -
J. Biol. Chem., 234, 476 (1959)

116. ROSSITER, R.J. -
J. Biol. Chem., 135, 431 (1940)

117. ROWSELL, E.V. -
Biochem. J., 64, 246 (1956)

118. RUSSELL, J.A., LONG, C.N.H. et WILHELMI, A.E. -
J. Exp. Med., 79, 23 (1944)

.../

119. SALTON, M.R.J. -
Nature, 180, 338 (1957)

120. SCHOENHEIMER, R. -
The Dynamic State of Body Constituents, Harvard Univ. Press, Cambridge, 1942

121. SHIVE, W. et SKINNER, C.G. -
Annual Rev. Biochem., 27, 643 (1958)

122. SIEKEVITZ, P. et POTTER, V.R. -
J. Biol. Chem., 215, 221 (1955)

123. SIMKIN, S.L. -
Annual Rev. Biochem., 28, 145 (1959)

124. SINITZINA, A.L. -
Biokhimia, 19, 80 (1954)

125. SMITH, A.H. -
J. Nutrition, 4, 427 (1931)

126. SNYDERMAN, S.E., NORTON, P.M., FOWLER, D.I. et HOLT, L.E. jr. -
J. Dis. Child, 97, 175 (1959)

127. SNYDERMAN, S.E., HOLT, L.E. Jr., SMELLIE, F., BOYER, A. et WESTALL, R.G. -
J. Dis. Child, 97, 186 (1959)

128. SYLIANCO, C.Y.L. et BERG, C.P. -
J. Biol. Chem., 234, 912 (1959)

129. TIPTON, S.R., WELDEN, F. et WEISS, A.K. -
Am. J. Physiol., 180, 321 (1955)

130. TREMOLIERES, J. et DERACHE, R. -
in "Biochemical Response to Injury", H.B. STONER, Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 23, 1960

131. TRISTRAM, G.R. -
in "The Proteins", H. NEURATH et K. BAILEY, Ed. Academic Press, New York, vol. 1 (pt A), p. 216 (1953)

132. UMBARGER, H.E. et MAGASANIK, B. -
J. Am. Chem. Soc., 74, 4253 (1952)

.../

133. UMBREIT, W.W. et TONHAZY, N. -
J. Biol. Chem., 191, 249 (1951)

134. VIGNEAUD (Du) V. et IRISH, O.J. -
J. Biol. Chem., 109, XCIV (1935)

135. VIGNEAUD (Du) V., SEALOCK, R.R. et Van ETTEN, C. -
J. Biol. Chem., 98, 565 (1932)

136. VOIT, C. -
Z. Biol., 3, 1 (1867)

137. WALTER, H. et MAHLER, H.R. -
J. Biol. Chem., 230, 241 (1958)

138. WARBURG, O. et CHRISTIAN, W. -
Biochem. Z., 296, 294 (1938); 297, 417 (1938); 298, 150 (1938

139. WEST, H.D. et CARTER, H.E. -
J. Biol. Chem., 122, 611 (1938)

140. WESTPHAL, U. -
Z. Physiol. Chem., 281, 94 (1944)

141. WOMACK, M. et ROSE, W.C. -
J. Biol. Chem., 107, 449 (1934)

142. WOMACK, M., SNYDER, B.B. et ROSE, W.C. -
J. Biol. Chem., 224, 793 (1957)

143. WOOD, J.L., COOLEY, S.L. et KELLEY, I.M. -
J. Biol. Chem., 186, 641 (1950)

144. WRETLIND, K.A.J. -
Acta Physiol. Scand., 20, 1 (1950)

145. WRETLIND, K.A.J. -
Acta Physiol. Scand., 25, 276 (1952)

146. WRETLIND, K.A.J. -
Acta Physiol. Scand., 36, 119 (1956)

147. WRETLIND, K.A.J. -
Der Anaesthesist, 6, 1 (1957)

-:-:-:-:-:-:-

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

"Les peptides antibiotiques"

Vu et approuvé :

PARIS, le 31 décembre 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. ZAMANSKY

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de PARIS,

Jean ROCHE